



**Contribution à l'évaluation et à l'optimisation des
application des systèmes microbio-électrochimiques :
traitement des eaux, production d'électricité,
bioélectrosynthèse**

Laure Lapinsonnière

► **To cite this version:**

Laure Lapinsonnière. Contribution à l'évaluation et à l'optimisation des application des systèmes microbio-électrochimiques : traitement des eaux, production d'électricité, bioélectrosynthèse. Autre. Université de Rennes, 2013. Français. NNT : 2013REN1S130 . tel-01002645

HAL Id: tel-01002645

<https://theses.hal.science/tel-01002645>

Submitted on 6 Jun 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Chimie

Ecole doctorale Science de la Matière

présentée par

Laure Lapinsonnière

préparée à l'Institut des Sciences Chimiques de Rennes (UMR 6226)
équipe Matière Condensée et Systèmes Electroactifs
UFR Structure et Propriété de la Matière

**Contribution à
l'évaluation et à
l'optimisation des
applications des
systèmes microbio-
électrochimiques :
traitement des eaux,
production
d'électricité,
bioélectrosynthèse**

**Thèse soutenue à Rennes
le 21/10/2013**

devant le jury composé de :

Christine Mousty

Directrice de recherche - Univ. Clermont Ferrand /
rapporteur

Manon Guille-Collignon

Maître de conférences - ENS Paris/ *rapporteur*

Sophie Tomasi

Professeure - Univ. Rennes 1 / *examineur*

Aude-Claire Houdon

Ingénieure - ADEME / *examineur*

Dónal Leech

Professor - Univ. Galway/ *examineur*

Korneel Rabaey

Professor - Univ. Gent / *examineur*

Théodore Bouchez

Ingénieur - IRSTEA Antony / *examineur*

Frédéric Barrière

Maître de conférences / *directeur de thèse*

Sommaire général

Introduction générale.....	9
-----------------------------------	----------

Chapitre 1 Les systèmes microbioélectrochimiques : principes et applications

Introduction.....	16
1 Principe des systèmes microbioélectrochimiques : l'association entre un biofilm électroactif et une électrode	18
1.1 Principe de fonctionnement d'un système électrochimique	18
1.2 Aspects fondamentaux des réactions aux électrodes et de leur catalyse.....	19
1.2.1 <i>Considérations thermodynamiques générales</i>	<i>19</i>
1.2.2 <i>Intérêt des catalyseurs.....</i>	<i>20</i>
1.2.3 <i>Spécificités liées à l'utilisation de microorganismes vivants.....</i>	<i>22</i>
1.3 Fonctionnement d'une bioanode microbienne	23
1.3.1 <i>Respiration des bactéries électroactives et production d'énergie bactérienne</i>	<i>24</i>
1.3.2 <i>Transfert des électrons à travers les membranes bactériennes et vers le milieu extracellulaire</i>	<i>26</i>
1.3.3 <i>Transfert d'électrons à l'interface bactérie-accepteur final solide</i>	<i>32</i>
1.3.4 <i>Conclusion sur le fonctionnement de bioanodes microbiennes.....</i>	<i>39</i>
1.4 Fonctionnement d'une biocathode microbienne	39
1.4.1 <i>Transfert des électrons de la cathode vers les membranes bactériennes</i>	<i>40</i>
1.4.2 <i>Implication des électrons de la cathode dans le métabolisme énergétique des bactéries</i>	<i>43</i>
1.5 Conclusion de la partie 1 et transition	45
2 Applications des dispositifs microbioélectrochimiques.....	46
2.1 Application dans des piles à combustibles microbiologiques	46
2.1.1 <i>Fonctionnement d'une pile à combustible microbiologique.....</i>	<i>46</i>
2.1.2 <i>Application à la production d'électricité couplée au traitement des eaux usées.....</i>	<i>47</i>
2.1.3 <i>Conclusion et transition</i>	<i>51</i>
2.2 Fonctionnement et application des électrolyseurs microbiens	52
2.3 Transition de la partie 2	56
3 Limites des systèmes microbioélectrochimiques et liens avec les travaux présentés dans ce mémoire .	56
3.1 Pertes liées aux catalyseurs.....	57
3.1.1 <i>Limites liées à la thermodynamique des réactions.....</i>	<i>57</i>
3.1.2 <i>Limites liées à la survenue de réactions parasites</i>	<i>59</i>
3.1.3 <i>Limites à l'interface avec l'électrode</i>	<i>59</i>
3.1.4 <i>Limites liées au transfert de masse et aux vitesses de métabolisation des bactéries.....</i>	<i>60</i>
3.2 Limites liées aux paramètres de fonctionnement du système microbioélectrochimique	60
3.2.1 <i>Chute ohmique</i>	<i>61</i>
3.2.2 <i>Limite liée à la concentration des réactifs et des produits à l'électrode.....</i>	<i>62</i>
3.3 Implication des limites évoquées avec les études entreprises durant ce travail de thèse	63
Références du Chapitre 1	66

Chapitre 2 Etude de l'adaptation des bioanodes à des changements de substrats anodiques

Introduction.....	80
1 Fonctionnement d'une anode microbiologique en vue d'une application à l'épuration d'eaux usées	82
1.1 Nécessité d'une syntrophie entre bactéries électroactives et bactéries fermentaires pour l'oxydation anodique de composés organiques complexes	82
1.1.1 <i>Rappels sur le métabolisme des bactéries électroactives.....</i>	<i>82</i>
1.1.2 <i>La syntrophie entre bactéries fermentaires et bactéries électroactives.....</i>	<i>84</i>
1.2 Démarches entreprises dans cette étude	86
1.2.1 <i>Adaptation à un substrat nouveau</i>	<i>87</i>
1.2.2 <i>Oxydation de substrats à l'anode : influence de la prédominance de bactéries électroactives à l'anode</i>	<i>87</i>
1.2.3 <i>Influence du renouvellement de l'anolyte sur les performances des bioanodes, pour deux substrats différents (l'acétate et le glucose).....</i>	<i>88</i>
2 Etude de l'adaptation de biofilms anodiques de maturité différente face à des changements de substrats.....	89
2.1 Temps de latence des bioanodes jeunes et matures face à un changement de substrat	90
2.2 Performances de bioanodes jeunes et matures pour l'oxydation de différents substrats fournis.	93
2.2.1 <i>Rapidité des biofilms à dégrader le substrat, après acclimatation</i>	<i>94</i>
2.2.2 <i>Efficacités faradiques.....</i>	<i>96</i>
2.2.3 <i>Puissances maximales des piles et leurs limitations</i>	<i>99</i>
2.2.4 <i>Courants catalytiques maximaux délivrés par les bioanodes.....</i>	<i>104</i>
2.2.5 <i>Electroactivité des molécules redox connectant le biofilm à l'anode suivant le substrat fourni</i>	<i>107</i>
2.3 Bilan.....	110
3 Etude de l'adaptation de biofilms anodiques face à des changements de substrats avec ou sans renouvellement de l'anolyte.....	111
3.1 Temps de latence consécutif à un changement de substrat.....	112
3.2 Rapidité des biofilms à dégrader le substrat (acétate et glucose) après acclimatation au substrat... ..	113
3.3 Efficacité faradique des biofilms anodiques sous acétate et sous glucose	115
3.4 Performances électriques et limitations des biofilms anodiques catalysant l'oxydation de l'acétate ou du glucose.....	116
3.5 Courants catalytiques de l'oxydation de l'acétate ou du glucose par les biofilms anodiques	118
3.6 Bilan.....	119
Conclusion du Chapitre 2	120
Section expérimentale	123
Description des piles à combustible microbienne utilisées	123
Construction du dispositif	124
Mesure d'efficacité faradique	125
Mesure de Carbone organique Total (COT)	126
Mesure de polarisation	126

Etude de l'électroactivité de biofilms	127
Références du Chapitre 2	128

Chapitre 3 Greffage d'acides phényle boroniques sur une électrode et influence sur les performances de bioanodes microbiennes

Introduction.....	136
1 Point bibliographique sur les modifications de surface d'électrodes et intérêt des acides boroniques en tant que modifiants	138
1.1 Formation de biofilms bactériens et facteurs influençant l'adhésion de bactéries sur des surfaces abiotiques.....	138
1.2 Etat de l'art sur les modifications de surface pour l'amélioration des performances de bioanodes..	139
1.2.1 <i>Modification de surface d'électrode visant à faciliter le transfert électronique des bactéries vers l'électrode</i>	<i>140</i>
1.2.2 <i>Modifications visant à améliorer l'affinité des bactéries pour la surface des électrodes.....</i>	<i>145</i>
1.2.3 <i>Récapitulatif et discussion sur l'effet des modifications de surface</i>	<i>150</i>
1.3 Réactivité des acides boroniques et propriétés des membranes des bactéries	152
1.4 Principe du greffage électrochimique de sels d'aryle diazonium pour modifier les propriétés de surface d'électrodes	156
2 Etude du greffage d'acides boroniques sur des surfaces d'électrode et de leur influence sur les performances d'anodes microbiologiques dans des piles à combustible	159
2.1 Etude du procédé de fonctionnalisation	159
2.1.1 <i>Généralités sur le procédé de fonctionnalisation et introduction aux études menées.....</i>	<i>159</i>
2.1.2 <i>Etude du procédé de fonctionnalisation</i>	<i>160</i>
2.1.3 <i>Transfert électronique sur la surface fonctionnalisée.....</i>	<i>162</i>
2.1.4 <i>Caractérisation des surfaces fonctionnalisées par spectroscopie infrarouge.....</i>	<i>165</i>
2.1.5 <i>Conclusion de la partie 2.1</i>	<i>168</i>
2.2 Influence des acides boroniques greffés à l'anode sur le temps de latence, la catalyse des réactions d'oxydation et la puissance délivrée.....	169
2.2.1 <i>Temps de formation du biofilm anodique</i>	<i>170</i>
2.2.2 <i>Puissances délivrées par les piles à combustible microbiologiques.....</i>	<i>171</i>
2.2.3 <i>Catalyse de la réaction d'oxydation de l'acétate par le biofilm anodique.....</i>	<i>172</i>
2.2.4 <i>Aspect des biofilms microbiens.....</i>	<i>175</i>
2.2.5 <i>Reproductibilité des résultats</i>	<i>178</i>
Conclusion et Perspectives.....	182
3 Section expérimentale du chapitre 3	184
3.1 Modification d'électrode par greffage électrochimique de sels d'aryle diazonium	184
3.1.1 <i>Synthèse du sel de paradiazophenylboronique pinacol ester.....</i>	<i>184</i>
3.1.2 <i>Modification électrochimique des électrodes à partir de l'acide 4 aminophenyle boronique pinacol ester.....</i>	<i>186</i>
3.1.3 <i>Etude des surfaces modifiées.....</i>	<i>186</i>

3.2 Etudes expérimentales des piles	189
Références du Chapitre 3	192

Chapitre 4 Etude de l'effet combiné de nanotubes de carbone et d'acides phényle boroniques sur les performances de bioanodes microbiennes

Introduction.....	201
1 Point bibliographique sur les nanotubes de carbone et leur effets sur la connexion de biofilms microbiens anodiques.....	202
1.1 Propriétés des nanotubes de carbone	202
1.2 Utilisation des nanotubes de carbone dans des systèmes microbioélectrochimiques.....	204
2 Etude des films de nanotubes de carbone déposés sur graphite et greffage d'acides phényle boroniques	207
2.1.1 <i>Caractérisation des films de nanotubes de carbone déposés sur graphite</i>	<i>207</i>
2.1.2 <i>Etude de la modification des films de nanotubes de carbone</i>	<i>208</i>
3 Influence combinée des nanotubes de carbone et des acides phényles boroniques sur les performances d'anodes microbiologiques	210
3.1.1 <i>Temps de formation des biofilms.....</i>	<i>210</i>
3.1.2 <i>Catalyse de la réduction de l'acétate.....</i>	<i>211</i>
3.1.3 <i>Aspects des biofilms microbiens</i>	<i>213</i>
Conclusion	215
Section expérimentale	216
Fabrication des électrodes	216
Dispositifs microbioélectrochimiques	216
Références du Chapitre 4	217

Chapitre 5 Etude de modifications de surface pour biocathodes microbiennes

Introduction.....	222
1 Rappels bibliographiques sur les biocathodes microbiennes	223
1.1 Catalyse microbienne de la réduction du dioxygène dans des piles à combustible microbiologiques	224
1.2 Electrosynthèse microbienne d'acides organiques à partir de la réduction de CO ₂	227
2 Effet du greffage de sels d'aryle diazonium chargés positivement sur les performances d'un biofilm catalysant la réduction du dioxygène dans une pile à combustible microbiologique	229
2.1 Procédure de modification et caractérisation des électrodes modifiées	230
2.1.1 <i>Procédure de modification.....</i>	<i>230</i>
2.1.2 <i>Caractérisation du transfert électronique hétérogène entre la surface modifiée et le ferricyanure de potassium</i>	<i>231</i>
2.2 Etude de la phase de développement des biocathodes microbiennes.....	233
2.2.1 <i>Courbes de polarisation</i>	<i>234</i>

2.2.2	<i>Catalyse de la réduction du dioxygène</i>	235
2.2.3	<i>Molécules électroactives détectées par voltamétrie cyclique</i>	237
2.2.4	<i>Bilan</i>	239
2.3	Caractérisation des biocathodes développées	239
2.3.1	<i>Courbes de polarisation</i>	239
2.3.2	<i>Catalyse efficace de la réduction du dioxygène mise en évidence par voltamétrie cyclique</i>	241
2.3.3	<i>Molécules électroactives détectées par voltamétrie cyclique</i>	243
2.3.4	<i>Biofilms microbien observés par Microscopie Electronique à Balayage (MEB)</i>	245
2.4	<i>Bilan</i>	257
3	Effet du greffage de sels d'aryle diazonium sur les performances de biofilms cathodiques homoacétogènes dans des électrolyseurs microbiens	249
3.1	Etude de la procédure de modification sur feutre de graphite	250
3.1.1	<i>Caractérisation des électrodes non modifiées</i>	250
3.1.2	<i>Fonctionnalisation avec un groupement positif</i>	251
3.1.3	<i>Fonctionnalisation avec des acides boroniques</i>	253
3.2	Premiers résultats d'électrosynthèse microbienne sur les feutres fonctionnalisés	255
3.2.1	<i>Dispositifs utilisés et mesures effectuées</i>	255
3.2.2	<i>Performances des électrolyseurs à cathodes non modifiées</i>	257
3.2.3	<i>Comparaison des performances des électrolyseurs à cathodes modifiées</i>	258
	Conclusion	261
	Section expérimentale	262
	Biocathodes réduisant le dioxygène	262
	<i>Dispositifs utilisés</i>	262
	<i>Mesures effectuées</i>	262
	Biocathodes réduisant le CO ₂ en acides organiques	263
	<i>Dispositifs utilisés</i>	263
	Références du Chapitre 5	265
	Conclusions générales et Perspectives	269



Introduction générale

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit traitent de systèmes microbioélectrochimiques. Il s'agit de dispositifs fonctionnant grâce à des réactions d'oxydation et de réduction catalysées par des microorganismes vivants sur des électrodes. Ces microorganismes sont en général des bactéries qui s'organisent en biofilm à la surface des électrodes. Les systèmes microbioélectrochimiques sont en fait une catégorie particulière de biotechnologies microbiennes dans le sens où elles s'appuient sur la diversité des métabolismes que l'on retrouve chez les microorganismes à des fins industrielles. Dans le cas des systèmes microbioélectrochimiques, les espèces bactériennes utilisées sont dites électroactives et présentent des métabolismes particuliers leur permettant d'échanger des électrons avec des solides tels que des électrodes. La diversité des espèces électroactives a permis d'envisager une multitude d'applications des systèmes microbioélectrochimiques, notamment le traitement d'eaux usées couplé à la production d'électricité ou à la production de molécules à forte valeur ajoutée ¹.

Par rapport aux systèmes électrochimiques plus conventionnels, les systèmes microbioélectrochimiques possèdent un certain nombre d'avantages ²:

- Ils permettent d'extraire de l'énergie à partir de déchets ou de combustibles/comburant renouvelables
- Les catalyseurs utilisés ne sont pas des métaux rares et coûteux mais des catalyseurs vivants capables de s'auto régénérer
- Les produits des réactions ne constituent pas des déchets toxiques

Ces avantages mettent en évidence l'intérêt des systèmes microbioélectrochimiques au regard des grandes problématiques contemporaines comme la recherche de productions industrielles renouvelables ou la diminution et la valorisation des déchets de l'activité humaine. Les associations entre bactéries et électricité ont découvertes au début des années 1910 mais ce n'est que depuis les années 2000, que ces associations sont devenues l'objet d'un domaine de recherche international et extrêmement dynamique. Au-delà de leurs intérêts dans ce contexte socio-économique actuel, les systèmes microbioélectrochimiques constituent un objet de recherche en lui-même fascinant et qui rassemble des disciplines scientifiques multiples : électrochimie, écologie microbienne, biologie moléculaire, biochimie, ingénierie. Cette recherche a pour but de mieux comprendre les mécanismes à l'œuvre dans les biofilms électroactifs et permettre une exploitation industrielle performante de ces systèmes.

En une dizaine d'années de recherche, les performances des premiers dispositifs ont été augmentées de 3 ordres de grandeur ³ et les mécanismes liés à la catalyse de réactions d'oxydo-réduction par des biofilms microbiens vivants sont mieux compris. Les enjeux scientifiques se concentrent en particulier sur les mécanismes moléculaires de transfert électronique dans les biofilms et vers l'électrode. Malgré une amélioration des performances et de la connaissance des électrodes microbiennes, les puissances délivrées sont toujours trop faibles pour envisager un passage des dispositifs de laboratoire à des pilotes industriels en conditions réelles. L'identification des limites des systèmes microbioélectrochimiques permet de cibler des paramètres à améliorer et oriente la recherche dans le domaine.

Le **premier chapitre** est une revue bibliographique sur les systèmes microbioélectrochimiques, en s'appuyant sur les exemples de deux dispositifs étudiés au cours de ce travail de thèse : la pile à combustible microbiologique et l'électrolyseur microbien. Cette revue bibliographique sera largement consacrée au fonctionnement des biofilms électroactifs anodiques et cathodiques. Il s'agira notamment de faire le point sur les connaissances et les hypothèses liées aux mécanismes de transfert électronique dans les biofilms et l'interface bactéries-électrode. Ce chapitre sera également consacré aux limites identifiées des systèmes microbioélectrochimiques, ce qui permettra d'introduire et de faire le lien avec les projets de recherche menés au cours de ce travail de thèse et discutés dans les chapitres suivants.

Le **second chapitre** est consacré à une application technologique des piles à combustible microbiologiques : le traitement des eaux usées couplée à la production d'électricité. Le traitement microbiologique des eaux est un procédé qui m'a intéressé particulièrement durant mes études d'ingénieur et il s'agit d'une des applications des anodes microbiologiques les plus étudiées. Or, les bactéries électroactives des biofilms anodiques ne sont capables de catalyser l'oxydation que d'acides organiques volatils tels que l'acétate. Lorsque des composés organiques plus complexes sont utilisés, d'autres bactéries doivent participer à l'oxydation du substrat. La mise en place d'associations microbiennes pour la dégradation de composés organiques complexes à l'anode peut modifier les performances des piles. Nous avons étudié l'adaptation de ces anodes microbiennes aux changements de substrats dans une perspective des bioanodes à l'oxydation de polluants organiques d'eaux usées.

Les autres chapitres ont été consacrés à l'amélioration de la connexion des biofilms électroactifs aux électrodes, considérée comme un des principaux facteurs limitants des performances des systèmes microbioélectrochimiques. Une approche pour améliorer cette connexion consiste à moduler les propriétés physico-chimiques de la surface des électrodes afin de promouvoir l'adhésion microbienne et le transfert électronique interfacial entre biofilm et électrode. Cette approche a fait l'objet des autres chapitres de ce travail de thèse. La modulation des propriétés de surface des électrodes a été réalisée par greffage covalent de sels d'aryle diazonium sur des électrodes ⁴.

Le **troisième chapitre** présente une modification de surface originale développée sur graphite et étudiée sur des anodes microbiennes dans des piles à combustible. L'originalité de cette modification est que contrairement aux autres traitements de surface jusqu'ici testés, la fonctionnalité chimique greffée (acide phényle boronique) vise de façon spécifique un composé de la membrane bactérienne (les lipopolysaccharides).

Le **quatrième chapitre** est un développement de l'étude discutée au chapitre 3. La procédure de fonctionnalisation a été testée sur nanotubes de carbone déposés en film sur du graphite. Ces nanotubes de carbone constituent un matériau d'électrode intéressant pour l'immobilisation de bio-macromolécules ⁵ et de microorganismes. L'effet combiné des nanotubes de carbone et de la fonctionnalisation de surface a été étudié et les premiers résultats sont discutés dans ce quatrième chapitre.

Le **cinquième chapitre** traite de la fonctionnalisation de surface de cathodes, pour deux applications distinctes : des biocathodes réduisant le dioxygène dans des piles à combustible microbiologiques et des biocathodes réduisant le CO₂ en acides organiques dans des électrolyseurs microbiens. A la cathode, très peu de modifications de surface ont déjà été testées car l'étude des biofilms microbiens cathodiques est plus récente^{1,6}. Pour les travaux présentés dans ce chapitre, des modifications déjà connues pour améliorer les performances des bioanodes microbiennes ont été étudiées sur les biocathodes.

¹ Logan B. E. Rabaey K., *Science* **337**, 2012, 686-690

"Conversion of wastes into bioelectricity and chemical by using microbial electrochemical technologies"

² Lapinsonnière L., Picot M., Barrière F., *ChemSusChem* **5**, 2012, 995-100

"Enzymatic versus microbial bio-catalyzed electrodes in bio-electrochemical systems"

³ Logan B. E., *Applied Microbial and Biotechnology* **85**, 2010, 1665-1671

"Scaling up microbial fuel cells and other bioelectrochemical systems"

⁴ Picot M., Lapinsonnière L., Rothballer M., Barrière F., *Biosensors and Bioelectronics* **28**, 2011, 181-188

"Graphite anode modification with controlled reduction of specific aryl diazonium salts for improved microbial fuel cells power output"

⁵ Wang J., *Electroanalysis* **17**, 2005, 7-14

"Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: A review"

⁶ Erable B., Féron D., Bergel A., *ChemSusChem* **5**, 2012, 975-987

"Microbial catalysis of the oxygen reduction reaction for microbial fuel cells : a review"

Chapitre 1

Les systèmes microbioélectrochimiques : Principes et applications

Sommaire

Introduction	16
1 Principe des systèmes microbioélectrochimiques : l'association entre un biofilm électroactif et une électrode	18
1.1 Principe de fonctionnement d'un système électrochimique.....	18
1.2 Aspects fondamentaux des réactions aux électrodes et de leur catalyse	19
1.2.1 <i>Considérations thermodynamiques générales</i>	<i>19</i>
1.2.2 <i>Intérêt des catalyseurs.....</i>	<i>20</i>
1.2.3 <i>Spécificités liées à l'utilisation de microorganismes vivants</i>	<i>22</i>
1.3 Fonctionnement d'une bioanode microbienne	23
1.3.1 <i>Respiration des bactéries électroactives et production d'énergie bactérienne...</i>	<i>24</i>
1.3.2 <i>Transfert des électrons à travers les membranes bactériennes et vers le milieu extracellulaire.....</i>	<i>26</i>
1.3.3 <i>Transfert d'électrons à l'interface bactérie-accepteur final solide.....</i>	<i>32</i>
1.3.4 <i>Conclusion sur le fonctionnement de bioanodes microbiennes.....</i>	<i>39</i>
1.4 Fonctionnement d'une biocathode microbienne	39
1.4.1 <i>Transfert des électrons de la cathode vers les membranes bactériennes.....</i>	<i>40</i>
1.4.2 <i>Implication des électrons de la cathode dans le métabolisme énergétique des bactéries</i>	<i>43</i>
1.5 Conclusion de la partie 1 et transition	45
2 Applications des dispositifs microbioélectrochimiques	46
2.1 Application dans des piles à combustibles microbiologiques.....	46
2.1.1 <i>Fonctionnement d'une pile à combustible microbiologique.....</i>	<i>46</i>

2.1.2	<i>Application à la production d'électricité couplée au traitement des eaux usées</i>	47
2.1.3	<i>Conclusion et transition</i>	51
2.2	Fonctionnement et application des électrolyseurs microbiens	52
2.3	Transition de la partie 2	56
3	Limites des systèmes microbioélectrochimiques et liens avec les travaux présentés dans ce mémoire	56
3.1	Pertes liées aux catalyseurs	57
3.1.1	<i>Limites liées à la thermodynamique des réactions</i>	57
3.1.2	<i>Limites liées à la survenue de réactions parasites</i>	59
3.1.3	<i>Limites à l'interface avec l'électrode</i>	59
3.1.4	<i>Limites liées au transfert de masse et aux vitesses de métabolisation des bactéries</i>	60
3.2	Limites liées aux paramètres de fonctionnement du système microbioélectrochimique	60
3.2.1	<i>Chute ohmique</i>	61
3.2.2	<i>Limite liée à la concentration des réactifs et des produits à l'électrode</i>	62
3.3	Implication des limites évoquées avec les études entreprises durant ce travail de thèse	63
	Références du Chapitre 1	66

Introduction

Ce travail de thèse est ancré dans un domaine scientifique assez récent et original qui est l'étude des systèmes microbioélectrochimiques. Au cœur du fonctionnement des systèmes microbioélectrochimiques, se trouve une association singulière entre des électrodes et des microorganismes vivants dit électroactifs, exoélectrogènes ou encore anodophiles. Dans cette association, les microorganismes peuvent être considérés comme de véritables catalyseurs dans les réactions d'oxydation et/ou de réduction se déroulant sur les électrodes. Ces microorganismes sont en général des bactéries qui forment des biofilms à la surface des électrodes.

Le fonctionnement des biofilms électroactifs sur des électrodes impliquent des phénomènes complexes et sont étudiés dans des disciplines scientifiques très diverses telles que l'électrochimie, l'écologie microbienne, la biochimie, la microbiologie moléculaire ou encore l'ingénierie de procédés. Ce premier chapitre a pour vocation d'introduire les notions générales pertinentes par rapport aux travaux présentés dans ce mémoire de thèse.

Dans une **première partie** de ce chapitre introductif, nous aborderons les aspects fondamentaux mis en jeu dans les systèmes microbioélectrochimiques, notamment les notions thermodynamiques et cinétiques liées aux réactions se déroulant aux électrodes, les phénomènes métaboliques permettant aux microorganismes d'oxyder ou de réduire des substrats en transférant des électrons aux électrodes. Ces mécanismes sont les notions de base permettant de comprendre l'ensemble de la thèse.

Dans la **seconde partie**, nous présenterons deux dispositifs de systèmes microbioélectrochimiques : la pile à combustible et l'électrolyseur microbien au regard de leurs applications respectives. En effet, les systèmes microbioélectrochimiques peuvent être utilisés sous plusieurs configurations. Historiquement, la première configuration est la pile à combustible microbiologique dans laquelle les réactions à l'anode et à la cathode permettent la production d'un courant électrique. La majorité des travaux présentés dans ce mémoire a été réalisé sur une application particulière des Piles à Combustible Microbiologiques ; il s'agit de la production d'électricité couplée à l'épuration d'eaux usées par oxydation à l'anode. Plus récemment, d'autres applications des systèmes microbioélectrochimiques ont été découvertes. Parmi ces applications, la pile à électrosynthèse microbienne est une configuration dans laquelle

le courant n'est pas produit mais fourni au système afin de produire par exemple des acides organiques grâce à une biocathode microbienne. Cette application plus récente des systèmes microbioélectrochimique a aussi fait l'objet d'étude au cours de cette thèse et c'est pourquoi son fonctionnement sera également expliqué dans cette seconde partie.

Enfin, dans la **troisième partie** de ce chapitre introductif, les limites des systèmes microbioélectrochimiques seront exposées. Cette dernière partie sera l'occasion de présenter les enjeux des travaux de cette thèse ainsi que l'articulation des chapitres qui constituent ce mémoire.

1 Principe des systèmes microbioélectrochimiques : l'association entre un biofilm électroactif et une électrode

1.1 Principe de fonctionnement d'un système électrochimique

Le fonctionnement d'un système électrochimique repose sur la conversion d'énergie chimique en énergie électrique et vice versa. Ainsi, en exploitant un tel système, il est possible soit de récupérer de l'énergie électrique à partir de composés chimiques (le système est alors une pile galvanostatique), soit de forcer des réactions à l'électrode en fournissant de l'énergie électrique (le système est alors un électrolyseur).

Les réactions globales en jeu dans un système électrochimique sont des réactions d'oxydoréduction durant lesquelles des électrons sont échangés entre deux espèces chimiques, l'une donneur d'électron dit réducteur et l'autre accepteur d'électrons, dit oxydant. La particularité de ces réactions des systèmes électrochimiques est que les demi-réactions sont séparées physiquement et que les électrons échangés circulent dans des matériaux conducteurs entre anode et cathode générant ou consommant un courant électrique. Dans le compartiment anodique ont lieu les réactions d'oxydations, l'électrode collectant les électrons issus de la réaction est appelée anode. Dans le compartiment cathodique ont lieu les réactions de réduction, l'électrode fournissant les électrons étant appelée la cathode. L'équilibre des charges dans les compartiments est assuré par la migration des ions à travers une membrane échangeuse d'ions qui séparent les deux compartiments. La **Figure 1** ci dessous illustre ce fonctionnement.

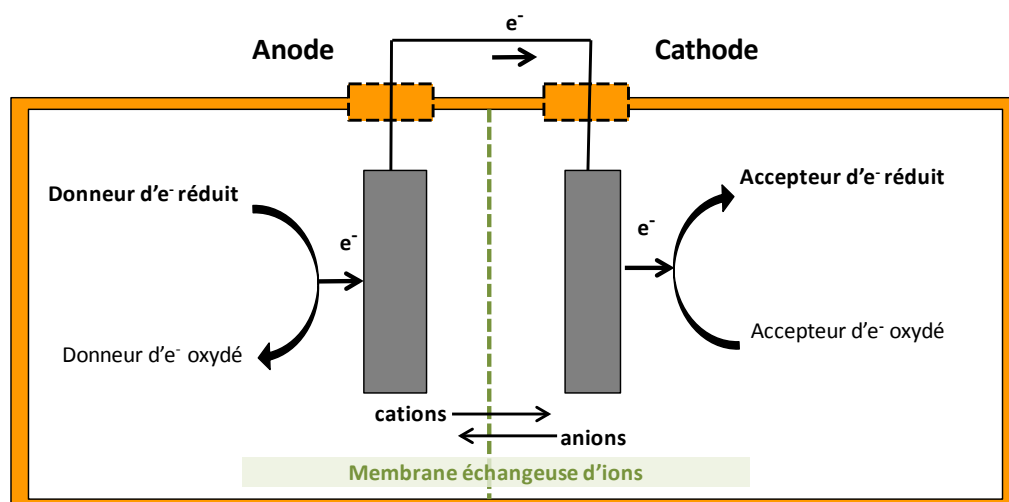


Figure 1 Schéma du fonctionnement d'un système électrochimique

1.2 Aspects fondamentaux des réactions aux électrodes et de leur catalyse

1.2.1 Considérations thermodynamiques générales

La conversion entre énergie électrique et énergie chimique dans un système électrochimique peut être traduite thermodynamiquement. Le travail d'un système électrochimique peut s'exprimer dans la variation d'énergie libre de Gibbs ΔG_r de la réaction globale du système :

$$\Delta G_r = \Delta G_r^0 + RT \ln (\pi)$$

- ΔG_r est la variation libre d'énergie de Gibbs (en Joule)
- ΔG_r^0 est la variation libre d'énergie de Gibbs standard calculée pour les conditions standards soit à une température de 298.15 Kelvin, une pression de 1 bar et une concentration de 1 M de toutes les espèces
- R est la constante universelle des gaz (8.31447 J.mol⁻¹.K⁻¹)
- T est la température en Kelvin (K)
- π est le quotient réactionnel c'est-à-dire le quotient de l'activité des produits sur l'activité des réactifs

Le travail d'un système électrochimique peut aussi s'exprimer grâce à la différence de potentiel thermodynamique, ΔE_{th} qui est déterminée par différence entre le potentiel anodique standard E_{anode} et le potentiel cathodique théorique standard $E_{cathode}$

$$\Delta G_r = -nF \Delta E_{th}$$

- ΔG_r est la variation libre d'énergie de Gibbs (en Joules)
- $\Delta E_{th} (V) = E_{cathode} - E_{anode}$
- nF est la charge transférée durant la réaction (Coulombs), calculée comme le produit de du nombre d'électrons échangés par mole de réactif (mol) et F est la constante de Faraday (9.64853.10⁴ C.mol⁻¹)

A partir des deux égalités ci dessous, on obtient :

$$\Delta E_{th} = -\Delta G_r / nF = -\Delta G_r^0 / nF - RT \ln (\pi) / nF$$

Cette équation permet aussi de faire la distinction entre deux types de configuration des systèmes électrochimiques. Lorsque ΔE_{th} est positive, cela signifie que la variation d'énergie libre de la réaction globale du système est négative. Cette réaction est thermodynamiquement favorisée et peut libérer de l'énergie électrique, le système fonctionne donc en pile galvanostatique. Dans ce cas, le potentiel standard de l'anode est inférieur au potentiel standard

de la cathode. Dans l'autre cas, ΔE_{th} du système est négative, ce qui signifie que la réaction requiert un apport d'énergie électrique pour se dérouler. Dans ce cas, le potentiel standard de l'anode est supérieur au potentiel standard de la cathode. Le système est alors une pile à électrolyse ou à électrosynthèse.

1.2.2 Intérêt des catalyseurs

La différence de potentiel thermodynamique est la différence de potentiel à courant nul maximale que peut atteindre un système électrochimique. En réalité, les réactions sont limitées par un certain nombre de facteurs, notamment les cinétiques lentes des réactions et la diffusion des espèces chimiques impliquées. Ces limites, détaillées dans la partie 3, affectent la différence de potentiel effective des systèmes par rapport à la différence de potentiel thermodynamique.

$$\Delta E_{systeme} = \Delta E_{th} - \sum \eta_i (V)$$

- $\Delta E_{systeme}$ potentiel du système mesuré à courant nul
- ΔE_{th} calculé thermodynamiquement
- $\sum \eta_i$ est la somme des facteurs limitants de la pile

Pour des piles galvanostatiques, la présence de surtensions engendre une plus petite ΔE_{th} et signifie qu'on récupère moins d'énergie que ce qui est possible thermodynamiquement. Pour des électrolyseurs, ces surtensions augmentent ΔE_{th} en valeur absolue. Il est donc nécessaire d'investir plus d'électricité que ce qui est requis thermodynamiquement afin de réaliser les réactions voulues. Ces limites, notamment liées aux cinétiques des réactions, peuvent rendre les systèmes électrochimiques inexploitable. Un moyen de surmonter ces limites cinétiques consiste à utiliser des catalyseurs des réactions d'oxydo-réduction.

Les catalyseurs sont des espèces chimiques capables d'accélérer les vitesses des réactions, en abaissant l'énergie d'activation. Différents types de catalyseurs sont utilisés dans les systèmes électrochimiques. Les catalyseurs utilisés encore classiquement en électrochimie sont des catalyseurs métalliques, comme le platine. Ce type de catalyseurs, certes très efficace, présente beaucoup d'inconvénients, notamment son coût élevé, sa rareté, ou encore le nombre limité de réactions qu'il catalyse.

Afin de s'affranchir de ces défauts des catalyseurs métalliques, des catalyseurs synthétisés chimiquement ont été utilisés. Ces catalyseurs sont souvent inspirés des catalyseurs biologiques

qu'on retrouve dans la nature. Il s'agit notamment des sites actifs de complexes protéiques impliqués dans les nombreuses réactions d'oxydo-réductions intervenant dans les échanges énergétiques des êtres vivants. On peut citer en exemple de ce type de catalyseurs dits biomimétiques, les porphyrines utilisées notamment pour catalyser la réduction du dioxygène.

En allant plus loin dans le mimétisme biologique, les chercheurs ont commencé à s'intéresser à l'utilisation de biocatalyseurs. Il ne s'agit plus d'imiter mais d'isoler des catalyseurs de type enzymatique, synthétisés par des êtres vivants. Ces catalyseurs d'origine biologique permettent d'accélérer une grande variété de réactions. Les biocatalyseurs sont peu onéreux et opèrent à partir de composés facilement disponibles et donc peu chers. Ces systèmes biomimétiques ou d'origine biologique ont cependant plusieurs défauts. Tout d'abord, ils se dégradent relativement rapidement et doivent être remplacés régulièrement (Lapinsonnière et al. 2012). De plus, ils ne sont capables de réaliser la catalyse que d'une étape réactionnelle et sont spécifiques d'un nombre très limité de substrats, notamment dans le cas des substrats organiques. Pour exploiter toute l'énergie disponible dans un substrat, il est souvent nécessaire de réaliser une suite complexe de réactions d'oxydo-réduction. Il est possible d'associer plusieurs catalyseurs biomimétiques ou d'origine biologique afin de réaliser des réactions à étapes multiples mais l'efficacité de la conversion est faible (Arechederra et Minter 2008, Sokic-Lazic et al. 2010). Enfin, dans le cas des enzymes isolées, le transfert électronique vers l'électrode peut être difficile car le site catalytique est souvent protégé à l'intérieur de la structure tridimensionnelle des polymères peptidiques de l'enzyme. Dans ce cas, des stratégies doivent être mises en place afin de faciliter le transfert électronique entre l'enzyme et l'électrode en utilisant des médiateurs redox, en immobilisant l'enzyme et/ou le médiateur redox sur des électrodes (Heller 1990, Heller 2006) ou encore modifiant chimiquement l'enzyme (Courjean et al. 2009). L'utilisation d'un médiateur redox peut poser des problèmes supplémentaires de coûts ou de fonctionnement et engendre une limite thermodynamique supplémentaire dans le système. L'immobilisation et la modification chimique des enzymes peut influencer la conformation tridimensionnelle du polymère peptidique ce qui engendre une catalyse moins efficace.

L'utilisation non pas d'enzymes isolées mais directement d'un organisme vivant entier en tant que catalyseur permet de se libérer des contraintes mentionnées précédemment qui sont le coût, le nombre restreint de réactions catalysées, la faible stabilité du catalyseur ou encore sa connexion difficile à l'électrode. On parle alors de système microbioélectrochimique. Le plus

souvent, les microorganismes impliqués sont des bactéries qui s'organisent en biofilm à la surface de l'électrode. Les espèces bactériennes intervenant comme catalyseurs aux électrodes sont dites électroactives.

1.2.3 Spécificités liées à l'utilisation de microorganismes vivants

L'utilisation de bactéries vivantes permet de réaliser des séries complexes de réactions d'oxydoréductions, car les intermédiaires réactionnels sont concentrés dans l'espace intracellulaire de la bactérie et sont acheminés efficacement à travers une série ordonnée d'enzymes. Un second avantage non négligeable des catalyseurs vivants est leur durée de vie en principe très longue puisque ces catalyseurs se régénèrent d'eux-mêmes. De plus, il existe un grand nombre de métabolismes microbiens différents et d'associations de plusieurs métabolismes qui permettent de catalyser des réactions électrochimiques à partir d'une grande diversité de substrats de départ. Enfin, les bactéries électroactives font partie d'espèces bactériennes particulièrement adaptées pour transférer à des solides les électrons générés par leur métabolisme.

On peut voir cette catalyse microbienne comme une catalyse enzymatique et plus précisément une catalyse faisant intervenir une cascade de réaction enzymatiques très organisée. Les mécanismes de ces biocatalyseurs sont légèrement différents des catalyseurs conventionnels métalliques ou synthétiques. En effet, on peut diviser leurs mécanismes en deux étapes. Tout d'abord, la catalyse débute avec l'étape de conversion du substrat, correspondant à la réaction d'oxydation ou de réduction du substrat. Cette étape n'a pas forcément lieu à l'électrode. Par exemple, pour les bactéries catalysant l'oxydation d'un substrat à l'anode d'un système électrochimique, cette étape d'oxydation se fait dans l'espace intracellulaire de la bactérie. Cette conversion suit une cinétique particulière décrite par le modèle de Michaelis-Menten lorsqu'on considère la catalyse d'une enzyme donnée ou par le modèle de Monod lorsqu'on considère l'ensemble de la bactérie (Harnisch et Schröder 2010). La seconde étape de la catalyse est le transfert hétérogène d'électrons qui a lieu à l'interface entre le catalyseur et l'électrode. Cette étape fait souvent intervenir des cytochromes de type c liés à la membrane externe des bactéries.

Un des aspects les plus singuliers de la catalyse microbienne est le caractère vivant du catalyseur. En raison de cette particularité, les bactéries utilisées dans les systèmes microbioélectrochimiques n'obéissent pas strictement à la définition d'un catalyseur. En effet,

un catalyseur classique n'est ni consommé ni altéré par la réaction et il n'intervient donc pas dans le bilan réactionnel. Or, les bactéries électroactives utilisent une partie de l'énergie des réactions d'oxydoréduction qu'elles catalysent pour leur propre maintenance et pour leur prolifération. A l'anode, ces bactéries connectées utilisent également une partie des donneurs d'électrons organiques fournis dans des réactions anaboliques leur permettant de synthétiser des nouveaux composants bactériens. Cette dissipation d'énergie est nécessaire et reste minime. A l'anode, les électrons liés à l'oxydation d'un substrat sont par conséquent transférés à un potentiel légèrement supérieur (plus positif) que le potentiel redox d'oxydation du substrat. A la cathode, la dissipation d'énergie due aux besoins des bactéries a pour conséquence que le potentiel auquel le transfert électronique a lieu entre l'électrode et la bactérie est légèrement plus bas (plus négatif) que le potentiel de réduction de l'accepteur final d'électrons.

Nous avons vu que la présence de catalyseur est bien souvent indispensable à la conversion efficace entre énergie chimique et énergie électrique. Parmi les différents types de catalyseurs, les microorganismes vivants présentent de nombreux avantages. Le mécanisme original de cette catalyse microbienne à l'électrode est présenté ci-après.

1.3 Fonctionnement d'une bioanode microbienne

Dans un système électrochimique, l'anode est le siège de réactions d'oxydation d'un substrat. Dans une bioanode, ces réactions d'oxydations sont catalysées par un biofilm microbien dit électroactif, anodophile ou encore exoélectrogène, colonisant l'anode. Les anodes ainsi colonisées sont alors appelées bioanodes. Cette association entre une anode et des bactéries électroactives est rendue possible par le métabolisme original de ce type de bactérie. Comparées à des eucaryotes et à des êtres vivants pluricellulaires, la structure et la physiologie des bactéries peuvent sembler assez primitives. Pourtant, on retrouve chez les espèces bactériennes une étonnante diversité de types métaboliques qui leur permet de s'adapter et survivre dans des environnements très variés. C'est pourquoi, l'Homme cherche à exploiter ces formidables machineries cellulaires, qu'on peut considérer comme de véritables mini-réacteurs (Bullen et al. 2006). Cette exploitation des microorganismes constitue un domaine particulier des industries biotechnologiques dont le principal défi est de sélectionner des souches bactériennes et des conditions de culture appropriées pour une production donnée.

A l'anode des piles à combustible microbiennes, les bactéries électroactives les plus connues et fréquentes telles que *Geobacter sulfurreducens* ou *Shewanella oneidensis* (Debabov 2008)

sont des espèces capables d'utiliser des oxydes métalliques solides comme accepteurs d'électrons dans leur métabolisme énergétique. C'est ce métabolisme original qui permet d'expliquer leur association avec des électrodes dans des systèmes électrochimiques. Dans de tels systèmes artificiels, les électrodes peuvent être considérées comme des substituts aux oxydes métalliques.

Chez l'ensemble des êtres vivants, et notamment chez les bactéries, les transferts électroniques sont des réactions essentielles du métabolisme énergétique. Pour les bactéries électroactives anodiques, ces réactions de transfert font intervenir un donneur d'électrons qui peut être un acide organique comme l'acétate (acide organique faisant partie des Volatil Fatty Acid ou acides gras volatils), et un accepteur d'électron solide qu'est l'anode.

1.3.1 Respiration des bactéries électroactives et production d'énergie bactérienne

Une des premières étapes dans la compréhension de l'interaction bactérie-anode a été de comprendre que les bactéries électroactives utilisent un métabolisme respiratoire à l'anode (Bond et al. 2002, Bond et Lovley 2003). Dans ce métabolisme, les acides gras volatils assimilés par la bactérie subissent un ensemble de réactions enzymatiques ordonnées qui entraînent leur oxydation progressive jusqu'au CO_2 . Ces réactions permettent aux bactéries de convertir l'énergie chimique des composés riches en électrons, tels que des acides organiques, présents dans son environnement en une énergie disponible facilement dans le compartiment intracellulaire. Cette énergie facilement exploitable pour la bactérie est i) soit stockée dans les liaisons P-O des groupements phosphates de la molécule d'Adénosine Tri Phosphate (ATP) ii) ou elle est présente comme pouvoir réducteur dans la cellule. Ce pouvoir réducteur prend la forme de coenzymes réduits tels que la Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NADH) et la Flavine Adénine Dinucléotide (FADH_2). Ces deux formes d'énergie qui sont le pouvoir réducteur et l'ATP, sont essentielles pour la survie, la croissance et la reproduction des bactéries.

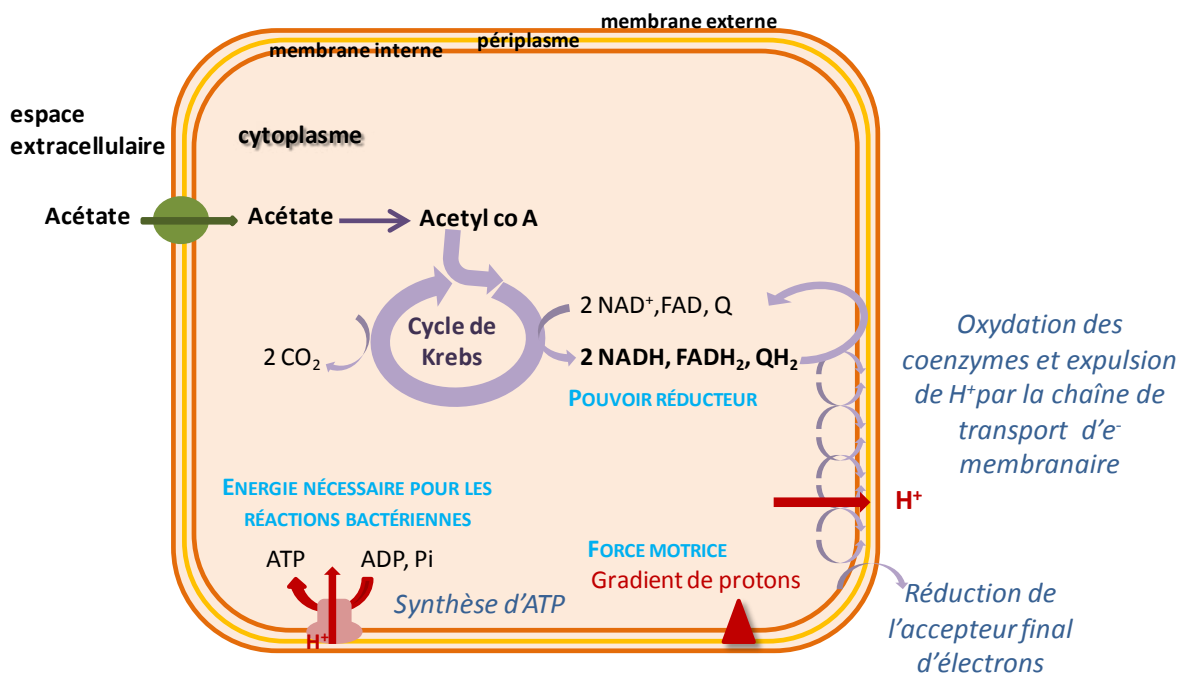


Figure 2 Schéma de la métabolisation de l'acétate chez les bactéries électroactives

L'oxydation des acides gras volatils est réalisée grâce à une voie métabolique complexe que l'on peut diviser en plusieurs grandes étapes. Prenons en exemple l'oxydation de l'acétate, le substrat le plus communément utilisé dans les études de bioanodes microbiennes (voir **Figure 2**). L'acétate est tout d'abord converti en acétyl coenzyme A. C'est cet intermédiaire réactionnel qui va subir une oxydation complète grâce à une série de huit réactions appelée le cycle de Krebs. Parmi ces réactions, quatre sont des réactions d'oxydoréduction qui font intervenir des enzymes appelés oxydo-réductases. Les réactions d'oxydations du cycle de Krebs sont couplées à la réduction de coenzymes et donc à la formation de pouvoir réducteur.

Ce pouvoir réducteur est ensuite utilisé dans une seconde grande étape métabolique visant à la génération d'un gradient de protons à travers la membrane bactérienne. Les coenzymes réduits NADH et FADH₂ se réoxydent en transférant des électrons à une série de complexes protéiques et de relais redox située dans la membrane des bactéries. Cette chaîne est appelée chaîne de transport d'électrons transmembranaire et est constituée de transporteurs d'électrons tels que les quinones ou encore des protéines redox contenant des hèmes. Les électrons circulent dans cette chaîne jusqu'à atteindre un accepteur final d'électron. La circulation des électrons se fait par oxydoréductions successives des enzymes de la chaîne. Ce flux d'électrons est couplé à l'expulsion de protons hors de l'espace intracellulaire et vers le périplasm de la bactérie ; il en résulte alors un gradient de protons à travers la membrane bactérienne.

C'est ce gradient de protons qui est utilisé dans l'étape finale du métabolisme respiratoire. Il constitue une force motrice fournissant l'énergie nécessaire à la synthèse d'ATP à travers une réaction appelée phosphorylation oxydative et permet ainsi de générer la source d'énergie cellulaire universellement utilisée par les êtres vivants.

Afin de comprendre comment l'énergie métabolique des bactéries électroactives peut être exploitée dans un système bioélectrochimique, il faut revenir à la chaîne transmembranaire de transport des électrons. Dans la respiration aérobie, l'accepteur final d'électrons est le dioxygène dissous dans le milieu intracellulaire. Dans le cas des bactéries exoélectrogènes, cet accepteur final a la particularité d'être un solide, *e.g.* un oxyde métallique ou une électrode. Les électrons sont donc transportés vers l'extérieur de la bactérie grâce à ce qu'on appelle le transfert d'électrons extracellulaire. Puis les électrons sont transférés vers un solide, en particulier ici une anode. Cette capacité à transférer des électrons hors de la cellule est la clef de l'association entre l'électrode et les bactéries électroactives. L'étude du transfert extracellulaire d'électrons est particulièrement documenté pour les deux espèces modèles de bactéries électroactives *Shewanella oneidensis* et *Geobacter sulfurreducens*. La revue bibliographique qui suit permet de faire le point sur ce qui est connu des mécanismes de transfert extracellulaire d'électrons chez ces deux espèces.

1.3.2 Transfert des électrons à travers les membranes bactériennes et vers le milieu extracellulaire

Dans un premier temps, le transfert extracellulaire d'électrons nécessite la traversée des structures qui limitent la bactérie du milieu extracellulaire. Mise à part quelques exceptions décrites dans la littérature (Freguia et al. 2009, Wrighton et al. 2011), les bactéries électroactives de l'anode sont en général des bactéries Gram négative ce qui signifie qu'elles sont délimitées par deux membranes lipidiques isolantes électriquement. Ces deux membranes sont séparées par un espace appelé périplasme. Une chaîne de transport d'électrons doit s'établir depuis la membrane interne, traverser l'espace périplasmique, atteindre la membrane externe, puis la surface de la membrane externe et enfin l'électrode. Chez *S. oneidensis* et *G. sulfurreducens*, les études montrent que ce transport des électrons à travers les membranes bactériennes fait principalement intervenir des protéines redox de type cytochrome. Ces cytochromes sont des protéines contenant un ou plusieurs cofacteurs transporteurs d'électrons non protéiques appelés hèmes. Parmi les nombreux hèmes trouvés dans la nature, les hèmes de type c sont particulièrement abondants chez les espèces bactériennes électroactives. Les hèmes sont des

molécules comprenant un noyau porphyrine complexé à du fer et capable de transporter un électron grâce à la réduction du Fe(III) en Fe(II).

Les modèles de transfert électronique extracellulaire proposés chez les deux espèces bactériennes anodophiles modèles se basent sur des études multidisciplinaires. Ainsi, la microbiologie moléculaire permettant d'identifier les gènes codant pour des cytochromes de type c et l'utilisation de délétions de gènes permet de repérer, parmi ces cytochromes, ceux ayant un rôle indispensable dans la réduction d'accepteurs finaux insolubles. Les études biochimiques permettent de localiser ces cytochromes dans les cellules bactériennes (cytoplasme, membrane interne, périplasme ou membrane externe) et d'étudier leur interaction, notamment les échanges d'électrons entre les hèmes d'un cytochrome multihémique ou entre cytochromes. Grâce à ces données, il est possible de reconstituer la séquence de cytochromes impliqués dans le transfert des électrons. Des données complémentaires sur ces échanges et sur les propriétés redox des protéines sont également obtenues par électrochimie. Malgré des zones d'ombres, le métabolisme par lequel l'espèce électroactive *Shewanella oneidensis* peut s'associer à une anode est particulièrement documenté. Dans les bioanodes à acétate cependant, l'espèce prédominante est souvent *Geobacter sulfurreducens* (Yates et al. 2012). Pour cette espèce les mécanismes sont moins bien compris. Les difficultés à identifier la séquence ordonnée des cytochromes est qu'il existe bien souvent des voies de transfert électronique redondantes. De plus, les résultats obtenus sur des protéines purifiées (études biochimiques et électrochimiques) sont différents des mécanismes *in vivo* impliquant une dynamique et un environnement plus complexe des protéines. La conformation des protéines et leurs propriétés redox sont notamment influencées par leur interaction avec les lipides de la membrane bactérienne et les micro-conditions de pH dans le périplasme. La revue bibliographique fait le point sur ce qui est connu du transfert électronique extracellulaire chez ces deux espèces.

Le modèle porine-cytochrome de *S. oneidensis*

L'étude du transfert extracellulaire d'électron est particulièrement documentée pour l'espèce électroactive modèle *Shewanella oneidensis* dont le génome séquencé révèle la présence de 39 gènes codant pour des cytochromes de type c (Weber et al. 2006). Les recherches s'intéressent particulièrement à la souche sauvage *S. oneidensis* MR-1 et à ses mutants et ont permis d'élucider de façon précise certaines voies de transfert électronique. Pour cette espèce, le

modèle dit « porine-cytochrome » a été établi pour expliquer le transfert des électrons du périplasme vers l'extérieur de la bactérie.

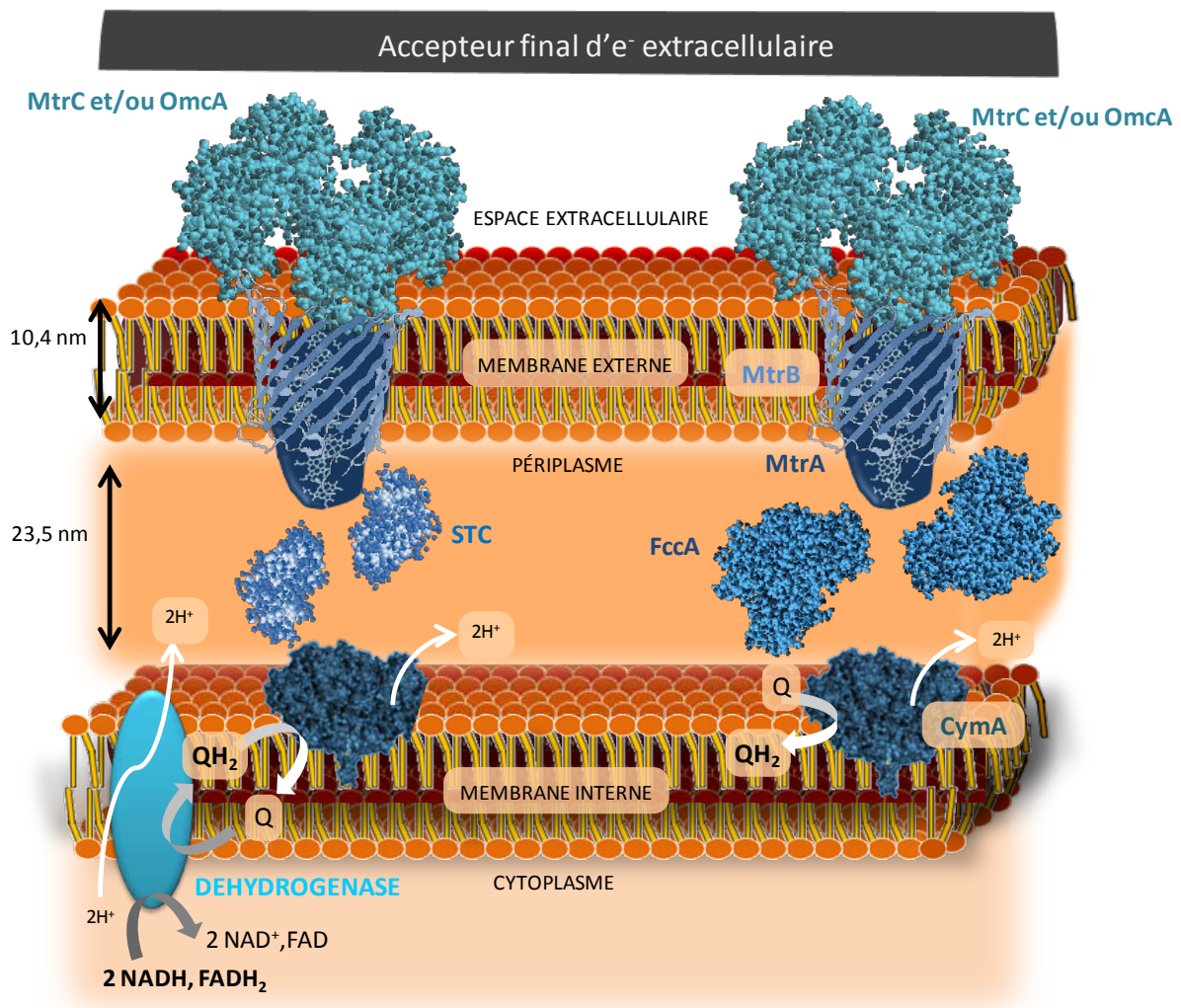


Figure 3 Schéma du modèle de transfert des électrons du cytoplasme vers la surface de *S. oneidensis* (Inspiré de Fonseca et al. 2013)

Dans ce modèle porine-cytochrome (voir **Figure 3**), le flux d'électrons dû à l'oxydation d'acides gras volatils traverse la membrane interne de la bactérie et permet, comme indiqué précédemment, l'établissement d'un gradient de proton. Ce flux d'électrons arrive à la membrane sous forme de cofacteurs réduits (NADH, FADH₂) et est transféré à une réserve de ménaquinones (voir structure **Figure 4**) liées à la membrane interne via une déhydrogénase.

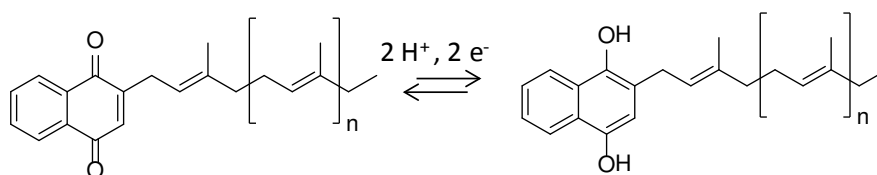


Figure 4 Structure de la ménaquinone MQ-n. E⁰ estimé à -0.494 V vs ECS pH 7.4 (McMillan et al. 2012)

Les électrons sont alors transportés par ces quinones qui viennent réduire un cytochrome membranaire A, CymA (voir **Figure 3**). Il s'agit d'un cytochrome à 4 hèmes de 21 kDa (Fonseca et al. 2013). CymA permet donc au flux d'électrons d'atteindre l'espace périplasmique. La largeur du périplasma qui est estimée à 23.5 nm rend impossible un transfert électronique direct de CymA vers les protéines redox situées dans la membrane externe, notamment le cytochrome MtrA (Fonseca et al. 2013).

Le transport des électrons entre les deux membranes se ferait donc grâce à des cytochromes navettes. Il existe un certain nombre de cytochromes du périplasma susceptibles de jouer ce rôle de navette, notamment des cytochromes à quatre hèmes tels que FccA et STC. Plusieurs études récentes ont permis d'élucider les voies de transfert entre CymA et ces cytochromes périplasmiques. Fonseca et al. (2013) ont par exemple élucidé en partie les voies de transfert des électrons entre les cytochromes CymA et FccA/STC de *Shewanella oneidensis* MR-1 à l'échelle moléculaire en employant notamment la spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (RMN). Selon cette étude, FccA and STC agissent comme des transporteurs d'électrons à travers le périplasma entre le cytochrome CymA situé sur la membrane interne et le cytochrome MtrA situé sur la membrane externe. Les deux intermédiaires FccA et STC possèdent des fonctions redondantes mais n'interagissent pas entre eux. Il existe d'autres cytochromes dans le périplasma, ce qui suggère que d'autres voies de transport des électrons existent entre les deux membranes mais ne sont pas encore élucidées.

Ainsi les électrons atteignent la face interne de la membrane extérieure de la bactérie par le cytochrome MtrA. Il s'agit d'un cytochrome à 10 hèmes de 35 kDa associé à la face périplasmique de la membrane externe. Elle fait partie d'une série de protéines codées par une association de gènes, l'opéron *omcA-mtrABC*. Il s'agit d'un opéron codant pour trois protéines associées dans un complexe. Ce complexe a été modélisé comme un complexe « porine-cytochrome ». Une porine est une protéine membranaire formant un pore hydrophile à travers les membranes bactériennes hydrophobes. Les porines servent en général à l'entrée de métabolites du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire. Dans le modèle « porine-cytochrome », le cytochrome MtrA est associé à la porine MtrB qui forme un canal de 3 à 4 nm à l'intérieur de la membrane externe. La protéine MtrA est enchâssée dans le canal formé par la porine MtrB où elle peut interagir avec MtrC un cytochrome à 10 hèmes associé avec la face extracellulaire de la membrane externe (Richardson et al. 2012). L'ensemble forme le complexe protéique MtrABC et donne son nom au modèle « porine-cytochrome ». MtrC est ensuite

capable de transférer des électrons directement ou non à un accepteur solide du milieu extracellulaire comme une anode en graphite. Cette capacité du complexe MtrABC à transférer des électrons à travers une bicouche lipidique vers un accepteur solide a été démontrée de façon élégante récemment (White et al. 2013). Dans leur étude, les auteurs ont créé un lipoprotéosome modèle en incorporant le complexe MtrABC dans une vésicule constituée d'une bicouche lipidique concentrique. Dans ce lipoprotéosome modélisant la configuration in vivo du complexe, MtrA fait face à l'intérieur de la vésicule et MtrC fait face à l'extérieur de la vésicule. Le transfert d'électrons entre un donneur électrons confiné dans le lipoprotéosome, le méthyle viologène, et un accepteur d'électrons solide sous la forme d'oxydes de fer a été étudié. White et al. (2013) montrent que la présence des trois protéines du complexe est nécessaire pour un transfert électronique direct entre le méthyle viologène et les oxydes de fer, ce qui confirme le modèle «porine-cytochrome» décrit pour *S. oneidensis*.

Il existe plusieurs cytochromes à 10 hèmes associés à la membrane externe, notamment OmcA, un homologue de MtrC. Le complexe MtrAB est aussi capable de transférer des électrons à des cytochromes à 10 hèmes de la membrane externe homologues de MtrC tels qu'OmcA, en cas de délétions du gène *mtrC* par exemple. D'autre part, MtrC et OmcA sont aussi capables d'échanger des électrons entre eux.

Un modèle esquissé pour *G. sulfurreducens*

Dans le cas de *Geobacter sulfurreducens*, les études montrent des similitudes avec les mécanismes de transfert de *S. oneidensis*. Cependant, l'élucidation reste plus difficile car son génome compte 111 gènes codant pour des cytochromes de type c. La multiplicité de ces gènes suggère qu'il existe un grand nombre de voies de transfert redondantes ce qui rend difficile l'identification de la succession des cytochromes impliqués dans les transferts d'électrons du cytoplasme vers la membrane externe.

Les études génétiques ont identifié un certain nombre de cytochromes indispensables à la réduction d'oxydes de fer chez *G. sulfurreducens*. Parmi ces cytochromes, MacA est un cytochrome dihémique de 36 kDa (Butler et al. 2004) qui jouerait un rôle similaire à CymA de *S. oneidensis*, c'est-à-dire celui de transférer des électrons depuis les facteurs réduits dans le cytoplasme vers le périplasme (voir **Figure 5**). La forte implication de MacA dans le transfert électronique extracellulaire a été démontrée par des études génomiques montrant i) que ce cytochrome est exprimé de façon plus importante si l'accepteur d'électron final est solide et que

ii) la délétion du gène codant pour MacA entraîne l'incapacité des bactéries à respirer un solide. De plus, le cytochrome MacA est associé à la membrane interne de *G. sulfurreducens* et on montre qu'il est capable de s'associer et de transférer des électrons vers des cytochromes du périplasme.

Par exemple, des études électrochimiques de Seidel et al. (2012) ont montré que MacA pouvait interagir avec PpcA, un cytochrome de type c de 9.6 kDa possédant 3 hèmes et présent dans le périplasme (Llyod et al. 2003). Les études génétiques (Llyod et al. 2003) montrent que chez des mutants de *G. sulfurreducens* pour lesquels l'expression de PpcA est supprimée, la réduction d'oxydes de fer solide est fortement inhibée. Ces résultats montrent l'importance de PpcA dans le transfert électronique vers l'extérieur de la bactérie. Après un temps de latence, les mutants sont à nouveau capables de réduire des oxydes de fer solides mais à une vitesse plus faible que la souche sauvage de *G. sulfurreducens*. Ces résultats suggèrent qu'il existe des voies de transfert extracellulaire redondantes et ne passant pas par l'intermédiaire PpcA, mais par d'autres cytochromes multihémiques de petite taille présents dans le périplasme de *G. sulfurreducens*.

La dernière étape de transfert électronique permet de faire parvenir les électrons vers des porteurs situés à l'interface entre la membrane externe des bactéries et le milieu extracellulaire. Le modèle « porine-cytochrome » a été établi pour *S. oneidensis* mais il n'est pas avéré dans le cas de *G. sulfurreducens* pour lequel cette étape du transfert électronique extracellulaire n'est pas élucidée. Le seul cytochrome de type c qui pourrait jouer le rôle de relais électronique ultime est OmcB en raison de sa localisation dans la membrane externe de la bactérie. La structure d'OmcB n'est pas connue mais l'analyse du gène codant pour cette protéine permet de prédire qu'il s'agit d'un cytochrome de type c de 85 kDa de 12 hèmes possédant un site d'attachement aux lipides (Leang et al. 2003). Des preuves de sa localisation dans la membrane externe ont été apportées par des études de marquage immunitaire et par des études biochimiques (Qian et al. 2007). Les auteurs de cette étude ont établi que OmcB était en partie inséré dans la membrane externe et en partie exposé au milieu extracellulaire. Cependant aucune étude n'a encore démontré son interaction avec des cytochromes du périplasme tels que PpcA ou avec d'autres cytochromes de la membrane externe. Enfin les études sur les mutants de *G. sulfurreducens* montrent que la délétion du gène codant pour OmcB n'a pas d'effet sur la génération de courant, ce qui indique qu'il existe d'autres voies de transfert électronique vers le milieu extracellulaire et ne passant pas par OmcB. Le cytochrome OmcB semble cependant important

dans le transfert électronique de la souche sauvage de *G. sulfurreducens* car il est très exprimé dans les biofilms électroactifs de *G. sulfurreducens* (Richter et al. 2009).

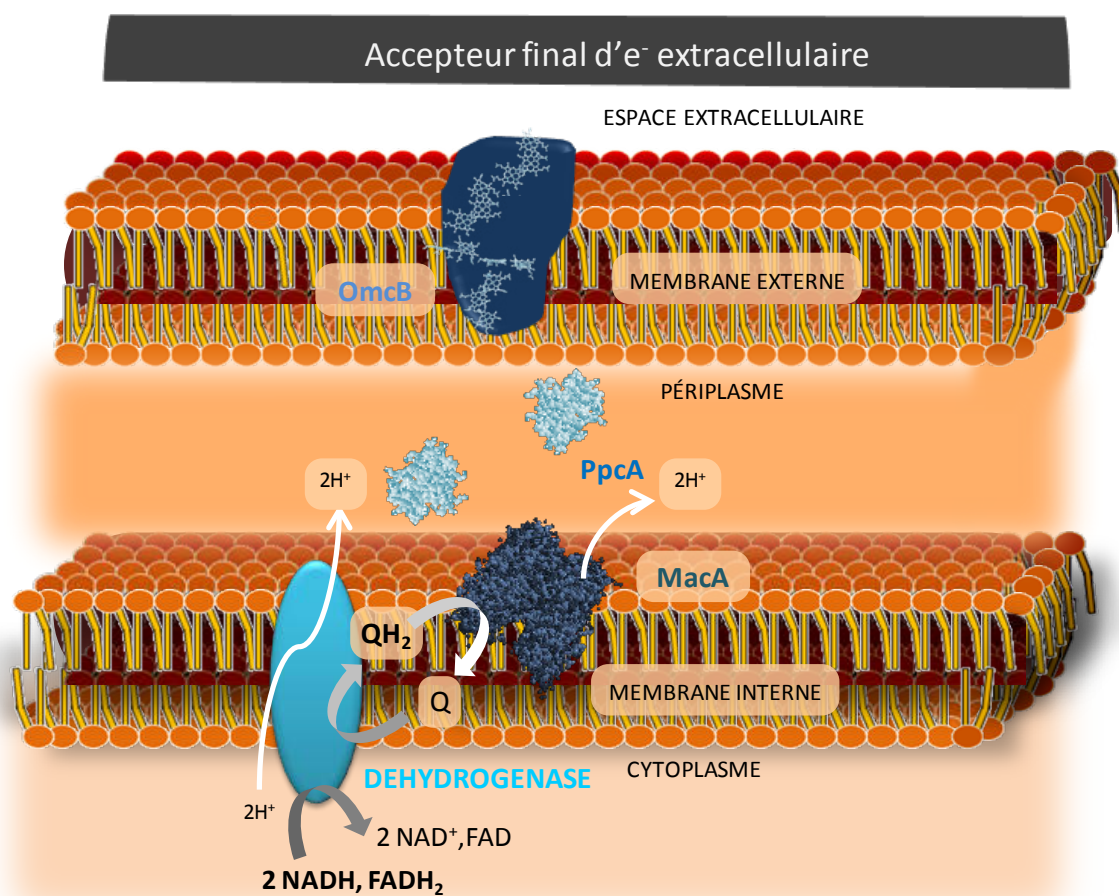


Figure 5 Schéma du modèle de transfert des électrons du cytoplasme vers la surface de *G. sulfurreducens*

1.3.3 Transfert d'électrons à l'interface bactérie-accepteur final solide

Une fois que les électrons atteignent la surface extérieure de la bactérie, leur transfert vers l'accepteur final solide ferait intervenir divers mécanismes simultanés et indépendants. Les mécanismes identifiés chez *S. oneidensis* et *G. sulfurreducens* incluent : i) le transfert direct vers l'accepteur solide, ii) le transfert indirect via des médiateurs sécrétés ou ajoutés artificiellement, iii) le transfert inter cytochromes ou/et le long de structures extracellulaires tels que les pilis. Les médiateurs et les pilis sont notamment utilisés pour des transferts électroniques longue distance et prédominent chez l'une ou l'autre de ces deux espèces électroactives. En effet, *S. oneidensis* est connue pour sécréter des médiateurs de type flavines. Marsili et al. (2008) par exemple, ont détecté par voltamétrie cyclique un médiateur redox présentant des caractéristiques similaires à la riboflavine (structure **Figure 6**) dans des biofilms de *S. oneidensis*.

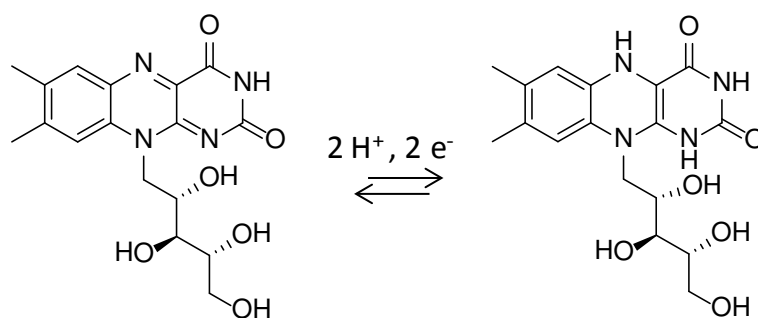


Figure 6 Structure de la riboflavine. E^0 estimé à -0.444 V vs SCE pH 7 (Marsili et al. 2008)

Pour *S. oneidensis*, quelques études ont montré la présence de pili conducteurs mais peu d'études ont été réalisées sur les pilis de cette espèce. L'espèce *G. sulfurreducens*, quant à elle, n'est pas connue pour sécréter des médiateurs redox, bien qu'elle soit capable d'utiliser des médiateurs redox artificiels (Nevin et Lovely 2000). En revanche, les études montrent que l'espèce *G. sulfurreducens* qui forme des biofilms plus épais que *S. oneidensis* utilise des pilis afin de transférer des électrons sur de longues distances. Les mécanismes de transfert électronique dans ces structures intriguent les chercheurs et fait l'objet de beaucoup d'études. Les paragraphes suivant détaillent ces étapes ultimes du transfert électronique vers les anodes pour *S. oneidensis* et *G. sulfurreducens*.

Transfert vers l'électrode pour *Shewanella oneidensis* (voir schéma Figure 8)

L'étude de la structure des cytochromes de la membrane extérieure des bactéries peut aider à comprendre les divers mécanismes impliqués dans le transfert électronique vers des solides comme les électrodes. La structure cristalline du cytochrome MtrF, un homologue de MtrC a été récemment résolue (Clarke et al. 2011). Elle révèle une organisation du cytochrome en 4 domaines (I-IV) dans lesquels les 10 hèmes (1-10) forment une croix : une chaîne de 6.5 nm formée par 8 hèmes parcourt le cytochrome dans sa longueur et relie les domaines II et IV. Cette chaîne est traversée par une seconde de 4.5 nm formée par 4 hèmes reliant les domaines I et III. Cette formation suggère que le transfert électronique à l'intérieur de ce cytochrome peut se faire selon trois directions, comme indiqué en **Figure 7**.

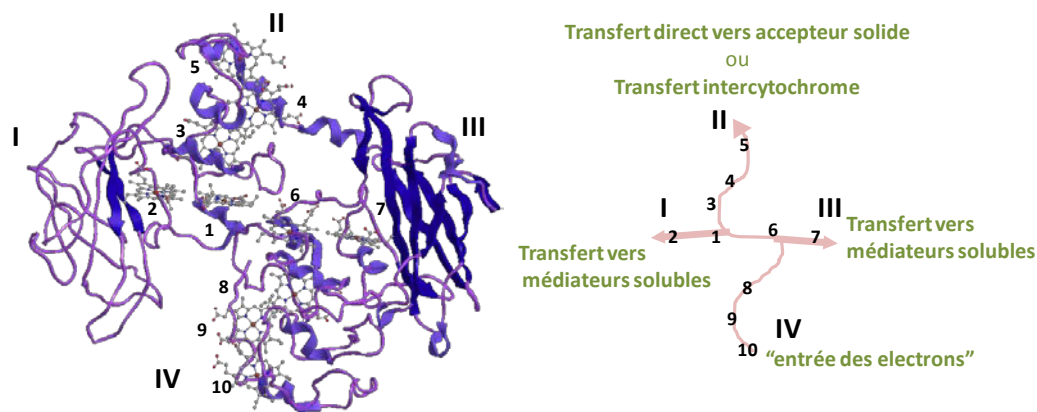


Figure 7 Structure cristalline de MtrF (code Protein Data Bank 3PMQ), cytochrome homologue de MtrC avec annotation des domaines (I-IV) et des hèmes (1-10) et voies de transfert des électrons proposées dans la molécule

i) le transfert direct vers l'accepteur solide :

De nombreuses études montrent que les cytochromes membranaires à 10 hèmes tels que MtrC, MtrF, ou OmcA sont capables de transférer directement des électrons à un accepteur solide (Hartshorne et al. 2007, Firer-Sherwood et al. 2011, Clarke et al. 2011, Leang 2012). La structure de MtrF suggère que lors d'un transfert direct vers un accepteur solide, les électrons emprunteraient la chaîne de huit hèmes reliant les domaines IV et II. L'entrée et la sortie des électrons se feraient alors par les hèmes 10 et 5 qui possèdent une configuration optimale pour un transfert rapide vers des accepteurs insolubles (Smith et al. 2006).

ii) le transfert indirect via des médiateurs sécrétés ou ajoutés artificiellement

Les bactéries électroactives sont capables d'utiliser des médiateurs redox afin de réduire des accepteurs d'électrons insolubles situés à longue distance (plusieurs nm). Ces médiateurs redox peuvent être sécrétés par la bactérie elle-même ou ajoutés artificiellement. *Shewanella oneidensis* est par exemple connue pour sécréter des médiateurs solubles de type riboflavine (voir structure **Figure 6**) ou flavine mononucléotide qui augmentent les cinétiques de transfert électronique vers une électrode (Burns et al. 2010, Jiang et al. 2010, Von Canstein et al. 2008). Les mécanismes exacts de ce transfert via médiateurs redox ne sont pas connus mais des études sur des souches mutantes de *Shewanella oneidensis* montrent que ce transfert implique le complexe MtrABC et le cytochrome OmcA. De plus, la structure des domaines I et III du cytochrome MtrF possèdent des sites protéiques connus pour permettre l'interaction avec des flavines mononucléotides. Le transfert des électrons du cytochrome MtrF vers des médiateurs redox solubles se ferait donc par les hèmes 2 et 7.

iii) le transfert inter cytochromes

Les biofilm bactériens sont riches en cytochromes. Ces cytochromes forment un réseau conducteur à l'intérieur de la matrice d'exopolysaccharides (Cao et al. 2001) qui cimente le biofilm. Dans un biofilm multicouche, ces cytochromes permettent le transfert électronique à longue distance, notamment pour les bactéries qui ne sont pas directement en contact avec l'électrode. Par exemple, la matrice d'exopolysaccharides de *S. oneidensis* contient les cytochromes MtrC et OmcA, qu'on peut retrouver par exemple sous la forme de complexes associant plusieurs de ces cytochromes (Shi et al. 2009). L'analyse de la structure de MtrF montre des possibilités d'interactions inter-cytochromes via les domaines I et IV. Ainsi, l'hème 10 d'un cytochrome et l'hème 5 d'un second cytochrome associé dans un complexe se retrouverait à une distance suffisante (< 1 nm) pour un transfert électronique rapide.

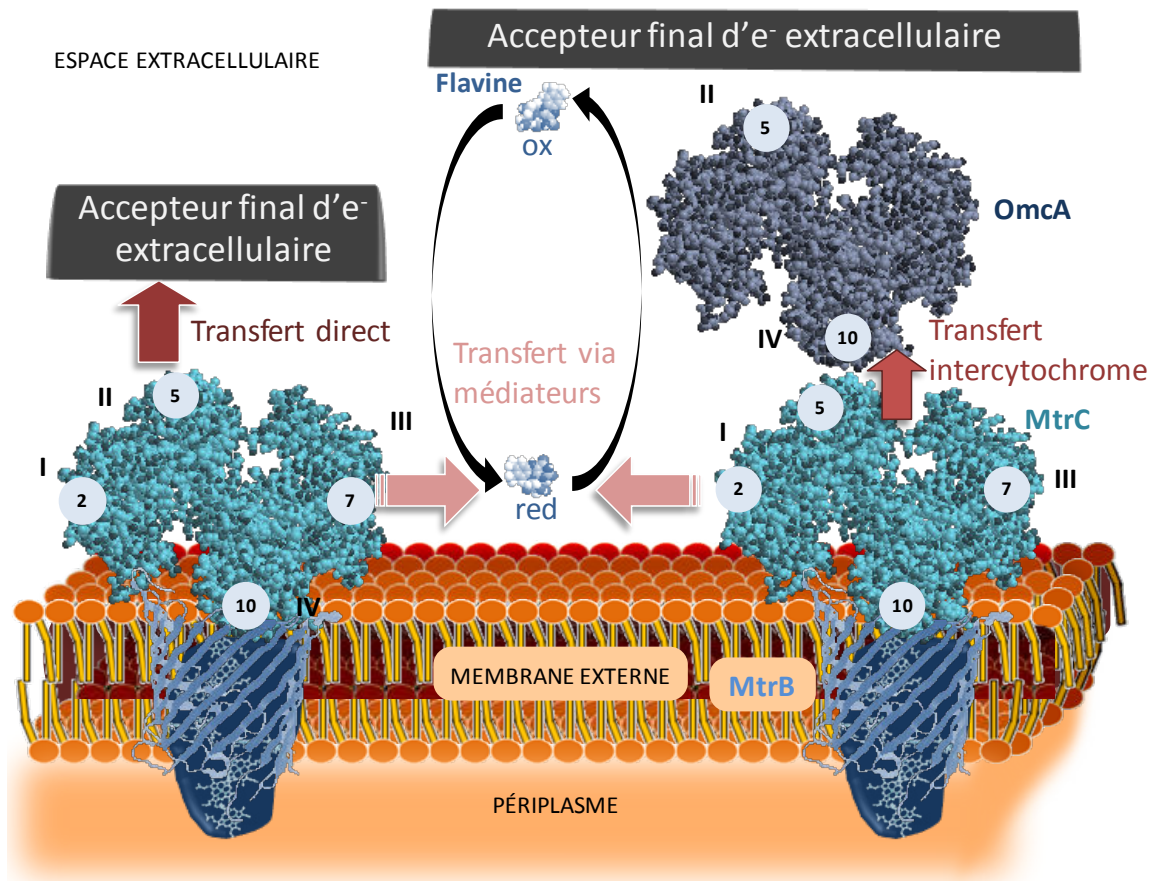


Figure 8 Schéma des voies de transfert d'électrons à l'interface bactérie-accepteur final solide, cas de *S. oneidensis*. Les hèmes hypothétiquement impliqués dans les différents mécanismes de transfert sont indiqués. Le transfert intercytochromes est schématisé sur des cytochromes libres dans le milieu extracellulaire.

Transfert vers l'électrode pour *Geobacter sulfurreducens* (voir schéma Figure 10)

Pour *G. sulfurreducens*, les mécanismes de transferts électroniques vers les électrodes sont réalisés soit de façon directe avec des cytochromes membranaires soit par les excroissances protéiques bactériennes appelées pili ou nanofils conducteurs. Afin d'identifier les cytochromes impliqués dans les dernières étapes de transfert des électrons vers une électrode, des études ont été réalisées sur les cytochromes associés à la membrane externe de *G. sulfurreducens*. Ces études consistent notamment à réaliser des délétions des gènes codant pour ces cytochromes de la membrane externe et d'étudier le comportement des souches mutantes de *G. sulfurreducens* générées (Nevin et al. 2009).

i) le transfert direct vers l'accepteur solide :

Les délétions de gènes ont ainsi permis d'identifier un cytochrome indispensable à la génération de courant ; il s'agit du cytochrome de type c OmcZ, exprimé de façon importante dans les biofilms d'une souche sauvage de *G. sulfurreducens* développés à la surface d'anodes (Richter et al. 2009). OmcZ (30kDa) possède 8 hèmes et a la capacité de s'auto-assembler en dimères ou trimères (Inoue et al. 2010). L'étude du génome d'OmcZ montre que ce cytochrome possède des sites d'attachement dans la membrane et des études de marquage immunitaire montrent que ce cytochrome est concentré à l'interface entre le biofilm et l'électrode (Inoue et al. 2011). Ces données suggèrent fortement qu'OmcZ a un rôle dans le transfert direct des électrons de *G. sulfurreducens* vers une anode. De plus, une délétion du gène codant pour OmcZ engendre une baisse importante et permanente de la production de courant par les biofilms de cette espèce (Nevin et al. 2009). Ce cytochrome aurait donc un rôle unique dans le transfert électronique vers une électrode. Ce rôle primordial d'OmcZ dans la génération de courant semble d'ailleurs confirmé par le fait qu'il n'existe pas d'homologues de ce cytochrome chez les autres espèces de *Geobacter* pour lesquelles la génération de courant à une anode est plus faible. Finalement, on peut voir OmcZ comme l'équivalent de MtrC chez *S. oneidensis*.

iii) le transfert par pili

L'importance des excroissances bactériennes appelées pili pour le transfert des électrons de *G. sulfurreducens* et une anode a été mise en évidence par des études génomiques. Les pili sont des structure protéiques formées par l'assemblage de monomères de protéines appelées pilines et mesurent de 3 à 5 nm de diamètre et jusqu'à 20 µm de long.

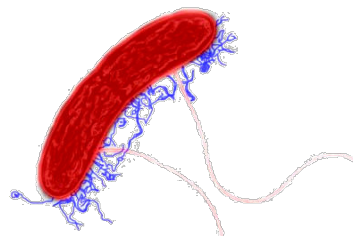


Figure 9 Image de Microscopie électronique à Transmission d'une coupe de *G. sulfurreducens*. (Source : Geobacter.org)

Ainsi Richter et al. (2009) montrent que le gène *pilA* responsable de la formation de ces structures est très exprimé dans les biofilm épais de *G. sulfurreducens* (30 et 50 μm). Nevin et al. (2009) montrent aussi que la délétion de *pilA* entraîne une baisse importante du courant produit par un biofilm de *G. sulfurreducens* développé sur une anode. De plus, pour la souche mutante, l'épaisseur du biofilm est beaucoup plus faible (4 μm) et les bactéries actives métaboliquement sont celles qui se situent à proximité de l'électrode (Reguera et al. 2006). Au contraire chez la souche sauvage, les biofilms sont épais (jusqu'à 50 μm) et les bactéries sont métaboliquement actives quelque soit leur position dans l'épaisseur du biofilm, ce qui démontre l'importance des pilis dans le transfert électronique longue distance. Le mécanisme de transfert électronique à l'intérieur des pilis est au cœur d'un débat scientifique extrêmement intéressant dans lequel deux théories s'affrontent. La première fait l'hypothèse d'un mécanisme classique appelé *superexchange model* (Strycharz-Glaven et al. 2011) où les électrons sont transmis d'hèmes en hèmes par échanges d'électrons entre les cytochromes associés aux pilis et à la matrice d'exopolymère du biofilm. L'autre hypothèse révolutionne la compréhension et la modélisation jusqu'ici largement admise des transferts électroniques dans le monde du vivant. En effet, ce deuxième modèle propose une conductivité de type métallique à base organique et liée aux protéines formant les pilis (Malvankhar et al. 2012). Dans ce modèle de conductivité de type métallique, les électrons sont délocalisés à l'intérieur des résidus aromatiques des acides aminés des monomères de piline. La conductivité se ferait par interactions π -stacking entre les résidus aromatiques. Pour le moment, aucune des deux théories ne fait consensus car les données expérimentales *in situ* sont difficiles à obtenir et la validité de certaines données existantes est discutée (Malvankhar et al. 2012, Strycharz-Glaven et Tender 2012). La validité des modèles proposés repose notamment sur la résolution de la structure des pilis, la distribution spatiale de l'ensemble des cytochromes de la matrice d'exopolymères et leur lien éventuel avec les pilis. Une difficulté supplémentaire empêche la validation d'un des modèles : les données ont été recueillies avec des souches différentes de *G. sulfurreducens*, ce qui rend toute comparaison

difficile. Le principal défaut du modèle de conductivité métallique à base organique est qu'il repose sur des données recueillies sur des biofilms fixés, non vivants et que certaines mesures ont été réalisées dans des conditions qui sont loin de refléter la physiologie des biofilms électroactifs. Si ce modèle est démontré, il fournirait de nouvelles perspectives d'études et d'application des biofilms électroactifs dans le domaine des matériaux organiques conducteurs d'origine biologique.

Un autre mécanisme non élucidé est le transfert des électrons des cytochromes vers les pili. En effet, le pili est attaché à la bactérie soit dans le périplasme soit dans la membrane interne. Des cytochromes présents dans le périplasme tels que PpcA permettrait de transférer des électrons aux pili, mais aucune données ne met en évidence de tels transferts. Sur la membrane externe, le cytochrome de type c, OmcS a été proposé comme relais permettant transfert électronique vers les pili. OmcS est un cytochrome de 50 kDa de 6 hèmes attaché de façon assez lâche à la membrane externe. Ce cytochrome possède en effet un domaine transmembranaire lui permettant d'être ancré dans la membrane. Il peut cependant s'en détacher assez facilement ce qui laisse penser qu'il est capable d'interagir avec des structures proches comme les pili (Mehta et al. 2005).

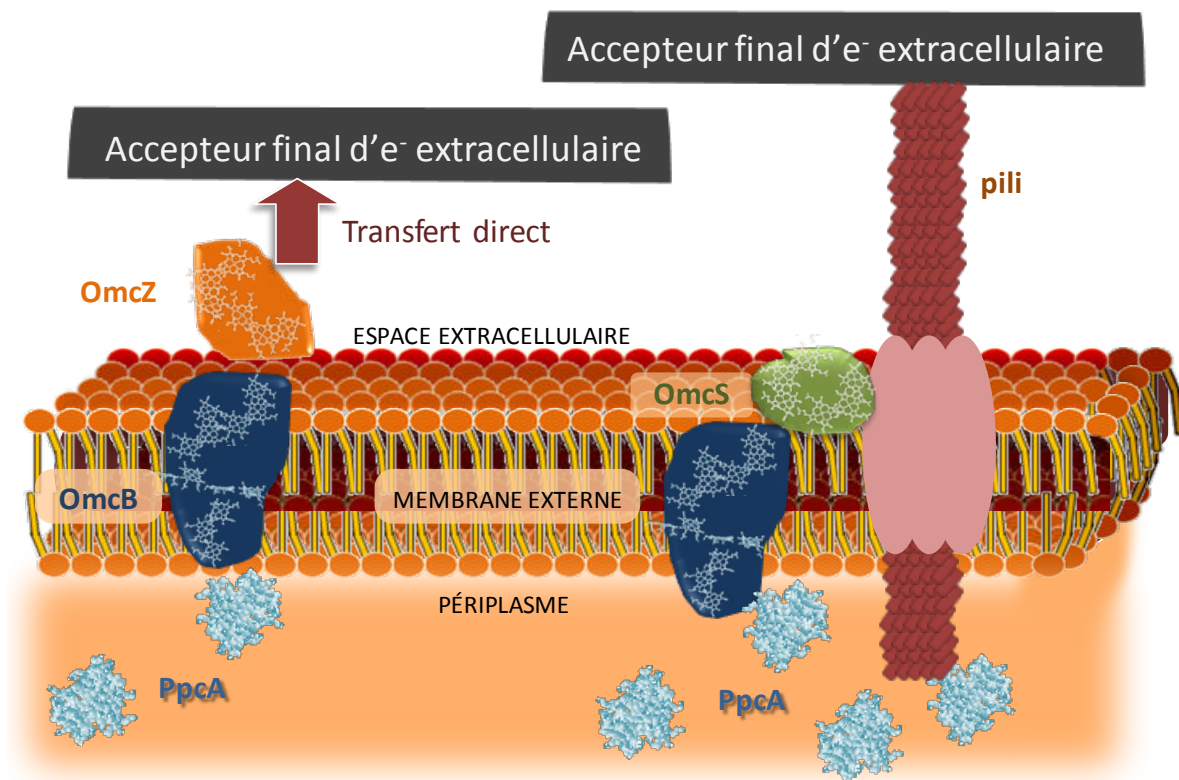


Figure 10 Schéma des voies de transfert d'électrons à l'interface bactérie-accepteur final solide, cas de *G. sulfurreducens*

1.3.4 Conclusion sur le fonctionnement de bioanodes microbiennes

Le fonctionnement des biofilms anodiques des systèmes microbioélectrochimiques est très documenté et bien que les mécanismes ne soient pas tous compris, on dispose de beaucoup d'informations sur l'interaction entre bactéries et anodes. Historiquement, la possibilité d'exploiter un métabolisme microbien pour générer un courant électrique a été découverte sur des biofilms anodiques. Les espèces bactériennes électroactives à l'anode peuvent être diverses mais quelques espèces prédominent et deux d'entre elles s'érigent en modèle, *Geobacter sulfurreducens* et *Shewanella oneidensis*. Leur métabolisme est une respiration particulière car au lieu d'utiliser un accepteur final d'électrons soluble qui diffuse dans le milieu intracellulaire, ces bactéries ont développé des stratégies évolutives leur permettant de transmettre de façon extracellulaire des électrons à un solide. Cette capacité est la clef permettant à ces bactéries électroactives de catalyser l'oxydation de composés organiques fournis comme substrat à l'anode d'un système électrochimique et de se servir de l'anode comme accepteur d'électrons. Il est relativement aisé d'obtenir des biofilms anodiques épais et fonctionnels à partir d'un mélange de bactéries en suspension (terreau, boues de station d'épuration, terre...) en laissant cet inoculum mixte en présence d'une anode connectée et d'un substrat organique adapté. Ceci permet d'expliquer que la majorité des études de biofilms électroactifs soient consacrées à des études anodiques.

En revanche, la découverte de la capacité de certains consortiums de microorganismes à catalyser des réactions de réduction à la cathode est bien plus récente (Gregory et al. 2004). Contrairement aux biofilms anodiques, il existe une grande diversité de biofilms cathodiques catalysant une multitude de réactions de réduction spécifiques. Cette diversité et le caractère récent de leur découverte expliquent que la compréhension de leur fonctionnement soit moins avancée que celle des biofilms anodiques. Les paragraphes suivants sont consacrés à l'état de l'art de la connaissance de ce second type de biofilm électroactif.

1.4 Fonctionnement d'une biocathode microbienne

Dans une biocathode microbienne, la cathode sert de donneur d'électrons tandis que l'accepteur d'électrons est une espèce chimique en solution qui est réduite par le biofilm cathodique. Parmi les espèces réduites par des biofilms microbiens cathodiques, on peut citer le dioxygène, les nitrates, le dioxyde de carbone, le trichloroéthène, le fumarate, l'uranium (VI) ou encore les sulfates. Les espèces bactériennes sont différentes selon les réactions dans lesquelles

elles interviennent. Dans le cas de la réduction du dioxygène de nombreuses espèces ont été isolées des biofilms (Cournet et al. 2010, Rabaey et al. 2008, Carbajosa et al. 2010, Xia et al. 2012, Erable et al. 2010, Parot et al. 2011). Ces espèces proviennent de nombreuses sources d'inoculum, notamment les boues de station d'épuration, les sols ou encore l'eau de mer. On constate une grande diversité des communautés microbiennes présentes dans les biofilms catalysant la réduction du dioxygène et aucune espèce ne prédomine. Pour d'autres biocathodes, les communautés microbiennes des biofilms sont davantage identifiées. Ainsi, dans les biocathodes réduisant les nitrates, il s'agit le plus souvent des bactéries dénitrifiantes (Puig et al. 2011, Gregory et al. 2004, Park et al. 2005, Clauwaert et al. 2007, Lefebvre et al. 2008, Virdis et al. 2008). Pour les biocathodes réduisant le CO₂ en acides organiques, les bactéries impliquées sont des bactéries acétogènes et des bactéries hydrogénotrophes.

Cette multiplicité des réactions et des espèces rend difficile la compréhension des phénomènes de transfert des électrons de la cathode aux bactéries et leur implication dans le métabolisme des bactéries. Quelques données expérimentales permettent de formuler des hypothèses, qui restent à confirmer.

1.4.1 Transfert des électrons de la cathode vers les membranes bactériennes

Deux types de mécanismes de transfert électronique de la cathode vers les bactéries sont reconnus : le transfert indirect et le transfert direct.

Transfert indirect

De nombreuses études décrivent des associations indirectes entre la cathode et les bactéries. Ces transferts électroniques indirects peuvent prendre plusieurs aspects. Un des premiers mécanismes de transfert suggérés fait intervenir le dihydrogène. En effet, beaucoup des bactéries impliquées dans les procédés de réduction cathodiques sont capables de métaboliser le dihydrogène (Rosenbaum et al. 2011). Suivant le potentiel appliqué, la cathode peut être capable de réduire des protons en dihydrogène, dihydrogène qui peut alors être impliqué dans le métabolisme bactérien. Ce mécanisme particulier a été suggéré pour les biocathodes réduisant le CO₂ en méthane (Clauwaert et al. 2007) ou encore celles réduisant le perchlorate en chlorure (Thrash et al. 2007).

Comme pour les bactéries anodiques, les bactéries de la cathode sont capables d'utiliser des médiateurs redox solubles. Dans la majorité des cas, les études rapportent l'utilisation de

médiateurs artificiels. On peut par exemple citer la catalyse de la réduction du dioxygène par une culture de *Acinetobacter calcoaceticus* en présence de pyrroloquinoline quinone (**Figure 11**), la réduction de perchlorate par une bactérie de la famille *Dechloromonas* en présence de 2,6-anthraquinone disulfonate (AQDS) (Thrash et al. 2007), ou encore la réduction de trichloroéthène en éthène par des bactéries de l'espèce *Dehalococcoides* en présence de méthyle viologène (Aulenta et al. 2010).

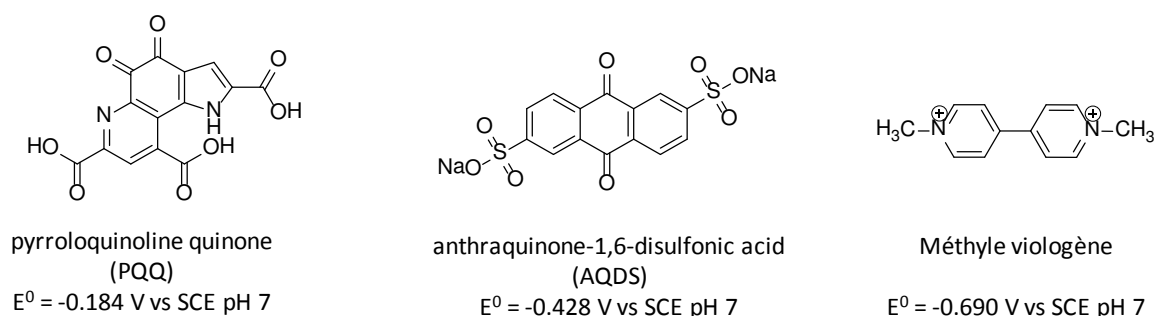


Figure 11 Structure de quelques médiateurs artificiels utilisés dans les biocathode microbiennes

Quelques études décrivent des transferts électroniques vers les bactéries par des médiateurs redox sécrétés. Par exemple, Freguia et al. (2010) détecte un médiateur sécrété par *Acinetobacter calcoaceticus* pour catalyser la réduction du dioxygène. Ce médiateur n'a pas été identifié mais son potentiel est proche de celui de la pyrroloquinoline quinone ($E = 0.184 \text{ mV vs SCE}$). Une autre étude décrit également l'utilisation de médiateurs de type flavine sécrétés par *Shewanella loihica* afin de catalyser la réduction du dioxygène (Liu et al. 2012). Un autre exemple de médiateurs sécrété a été découvert après filtration du milieu de culture d'une biocathode réduisant le trichloroéthène (Aulenta et al. 2009).

Un autre mécanisme de transfert électronique indirect spécifique entre la cathode et les bactéries est réalisé par l'intermédiaire de manganèse jouant le rôle de médiateur redox (Clauwaert et al. 2007, Nguyen et al. 2007, Rhoads et al. 2005). Des oxydes de manganèse MnO_2 à l'état solide sur l'électrode sont d'abord réduits par les électrons fournis à la cathode en MnOOH , puis en H_2O et en ions Mn^{2+} relâchés dans le catholyte. Ces ions Mn^{2+} sont ensuite utilisés par les bactéries qui couplent leur oxydation en MnO_2 à la réduction du dioxygène. Les oxydes MnO_2 reformés par les bactéries précipitent à nouveau à la cathode.

Transfert direct

Que ce soit sur des cultures pures ou des cultures mixtes, plusieurs études (Gregory et al. 2004, Butler 2010, Cournet et al. 2010, Carbajosa et al. 2010) tendent à montrer que le transfert des électrons peut se faire directement d'une cathode vers les bactéries, par l'intermédiaire probable de cytochromes de type c associés aux membranes bactériennes. La famille *Geobacter* possède des espèces bactériennes capables de transférer directement des électrons vers des accepteurs insolubles (*Geobacter sulfurreducens*) mais aussi de les recevoir directement de donneurs d'électrons insolubles (*Geobacter metallireducens*, *Geobacter lovleyi*). Le transfert direct des électrons de la cathode vers les bactéries a été démontré sur d'autres espèces bactériennes telles que *Shewanella putrefaciens* (Freguia et al. 2010), *Micrococcus luteus* (Cournet et al. 2010).

Les protéines redox de la membrane externe susceptibles d'être impliquées dans ces transferts directs n'ont pas été identifiées. Cependant, en prenant pour modèle les espèces bactériennes connues pour pouvoir oxyder des donneurs d'électrons insolubles dans leur milieu naturel, telles que *Acidithiobacillus ferrooxidans*, on peut penser que ces protéines sont des cytochromes de type c. Cette espèce bactérienne est en effet capable d'oxyder du Fe(II) insoluble en Fe(III) grâce au cytochrome Cyc2 (Carbajosa et al. 2010).

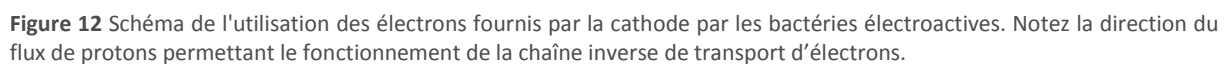
D'autre part, des études ont montré que des bactéries développées en tant que bioanodes pouvaient se transformer en biocathodes après changement des conditions expérimentales. Par exemple, Rozendal et al. (2008) montrent qu'un biofilm anodique oxydant l'acétate et développé sur une électrode polarisée à -0.2 V vs Ag/AgCl est capable de produire du dihydrogène si l'électrode est polarisée à -0.7 V vs Ag/AgCl. La production de dihydrogène est alors 8 fois plus importante que sur une cathode abiotique. Une autre étude a été réalisée cette fois-ci en maintenant le potentiel de l'électrode (-0.300 V vs Ag/AgCl) mais en alternant des conditions anaérobies en présence d'acétate et d'un bullage d'air près du biofilm en absence d'acétate (Cheng et al. 2010). Le biofilm initialement développé comme bioanode est capable de réduire le dioxygène en produisant un courant jusqu'à 10 fois supérieur à celui d'une cathode abiotique. On pourrait ainsi penser que les deux types de transfert, vers l'électrode et depuis l'électrode, font intervenir les mêmes complexes protéiques. Or, Strycharz et al. (2011) ont montré que l'expression des gènes de *Geobacter sulfurreducens* ainsi que les conséquences de délétions de gènes étaient différentes lorsque les électrons sont transférés vers ou depuis une électrode. Ces

observations suggèrent que les mécanismes et donc les complexes protéiques ne sont pas les mêmes dans les deux cas.

1.4.2 Implication des électrons de la cathode dans le métabolisme énergétique des bactéries

A l'anode, le lien entre le métabolisme des bactéries électroactives et l'anode est établi. Le métabolisme des bactéries de la bioanode est une respiration ; ceci signifie que les bactéries récupèrent de l'énergie par l'oxydation d'un substrat organique, tel que l'acétate. Il s'agit d'une respiration très particulière car l'accepteur d'électrons est un solide. Il est reconnu que grâce à cette respiration, les bactéries du biofilm anodique sont capables de se servir de l'anode pour se développer et pour se multiplier. En revanche, dans le cas des biocathodes, le lien entre les électrons fournis à la cathode et le métabolisme des bactéries du biofilm n'est pas élucidé. Certains mécanismes de réduction cathodique ne bénéficieraient pas à la croissance des bactéries et ne résulteraient que des effets fortuits de la présence de bactéries à proximité de la surface de la cathode (Rabaey et al. 2011). Il est tout de même très probable que les bactéries s'organisant en biofilm sur la surface de la cathode exploitent activement les électrons fournis par la cathode pour produire l'énergie nécessaire à leur croissance et à leur multiplication.

Afin de comprendre le métabolisme des bactéries de l'anode, les études sont menées sur des bactéries réduisant des oxydes de métaux insolubles. Ainsi, pour comprendre le métabolisme des bactéries de la cathode, on peut étudier les espèces bactériennes connues pour pouvoir oxyder des donneurs d'électrons insolubles dans leur milieu naturel. Le métabolisme de ces bactéries n'est pas une respiration mais fait partie des métabolismes dits « chimiolithotrophes ». Ces bactéries chimiolithotrophes, dont plusieurs espèces ont été isolées de biofilms cathodiques (Lapinsonnière et al. 2012), utilisent l'énergie chimique récupérée de l'oxydation d'espèces inorganiques afin de produire de l'ATP et du pouvoir réducteur sous forme de cofacteurs réduits tels que NADH, NADPH ou FADH₂. L'accepteur final d'électrons étant soluble dans le milieu, comme par exemple l'oxygène. Les études génétiques et biochimiques suggèrent que des chaînes de transport composées de cytochromes de type c et d'hydrogénases (Rosenbaum et al. 2011) s'établiraient entre les membranes et le cytoplasme des bactéries où a lieu l'ultime transfert d'électrons vers l'accepteur final d'électron soluble (voir schéma **Figure 12**)



44

constitue l'autre forme d'énergie indispensable aux bactéries. Pour les bactéries chimiolithotrophes, la réduction des cofacteurs NADH, NADPH ou FADH₂ est une réaction endergonique rendue possible grâce aux transferts d'électrons dans une chaîne de transport d'électrons dite inverse. Cette chaîne de transfert inverse a besoin d'un apport énergétique pour fonctionner. Cette énergie est fournie par la force liée au gradient de protons transmembranaire. Les cofacteurs réduits et l'ATP servent par la suite à la synthèse de composés organiques soit à partir de CO₂, on parle alors de bactéries litho-autotrophes ou alors à partir de composés organiques et on parle de bactéries litho-hétérotrophes. Dans les biocathodes, certaines bactéries sont autotrophes, typiquement les bactéries produisant des acides organiques à partir de CO₂ (Nevin et al. 2010). Pour d'autres types de biocathodes, il est possible que litho-hétérotrophie et litho-autotrophie se combinent (Rabaey et al 2011).

Bien qu'il ait été établi que les bactéries utilisant des oxydes de fer dans leur milieu naturel et les bactéries utilisant une électrode n'exploitent pas exactement les mêmes complexes redox membranaires, on peut imaginer que les mécanismes de transfert soient similaires. La Figure 12 représente de façon schématique les mécanismes probables du métabolisme des bactéries électroactives à la cathode, en prenant un modèle établi pour *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Castelle et al. 2008).

1.5 Conclusion de la partie 1 et transition

Les systèmes microbioélectrochimiques exploitent des réactions d'oxydo-réduction catalysées par des microorganismes afin de convertir de l'énergie électrique en énergie chimique et vice versa. Il existe une grande diversité de configurations de ces systèmes dont le point commun est la catalyse d'au moins une des réactions par un biofilm microbien. Les microorganismes électroactifs utilisés à l'anode sont en majorité des bactéries de l'espèce *Shewanella oneidensis* ou des bactéries de la famille des *Geobacter*. Ces dernières bactéries, particulièrement adaptées aux conditions de vie imposées dans le compartiment anodique, deviennent prédominantes alors même que la source de bactéries utilisée pour l'inoculation de l'anode contient une grande diversité d'espèces microbiennes (Yates et al. 2012). A l'inverse, à la cathode des systèmes microbioélectrochimiques, les réactions de réduction ne sont pas forcément catalysées par des microorganismes et on les qualifie d'abiotiques. Lorsqu'elles sont catalysées par des microorganismes, les biocathodes améliorent le caractère durable du dispositif et permettent de diversifier les réactions de réduction utilisées. Contrairement à ce qui

est observé dans la bioanode, chaque réaction de réduction fait intervenir des espèces bactériennes spécifiques. La diversité des réactions de réduction utilisables à la cathode rend les applications des dispositifs microbioélectrochimiques très variées.

2 Applications des dispositifs microbioélectrochimiques

Les dispositifs microbioélectrochimiques peuvent se décliner en diverses configurations. Une grande partie de mon travail de thèse a été réalisée sur la configuration en pile à combustible microbiologique. Une autre configuration a également été abordée, il s'agit de la pile à électrosynthèse microbienne. J'ai donc choisi de présenter ces deux configurations ainsi que leurs différentes applications.

2.1 Application dans des piles à combustibles microbiologiques

2.1.1 Fonctionnement d'une pile à combustible microbiologique

Les piles à combustible microbiologiques sont des piles galvanostatiques, elles sont donc capables de fournir de l'énergie sous forme d'électricité. La réaction chimique globale en jeu dans les piles à combustible microbiologiques est donc exergonique. Le fonctionnement de la pile est illustré par le schéma ci-dessous.

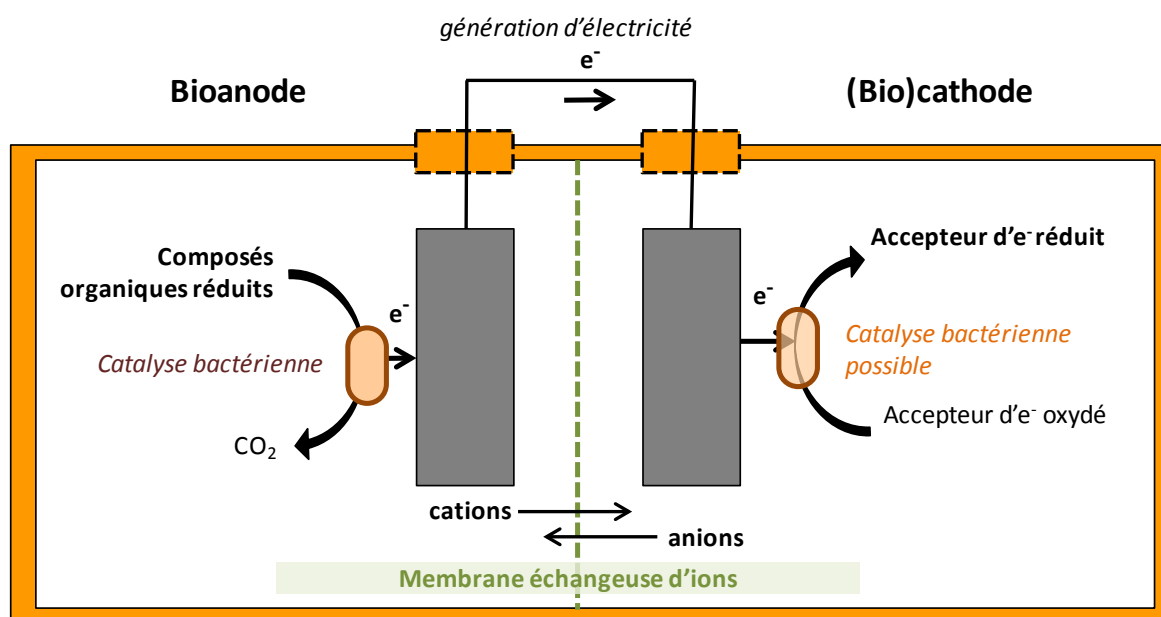


Figure 13 Schéma du fonctionnement d'une pile à combustible microbiologique

A l'anode, les composés organiques fournis en tant que substrats sont oxydés en CO_2 par les bactéries électroactives grâce à leur métabolisme respiratoire. Les bactéries électroactives qui sont développées sous forme d'un biofilm sur l'anode transfèrent les électrons issus de cette oxydation vers la surface de l'anode. Les électrons circulent dans un circuit externe jusqu'à la cathode. A la cathode, les électrons sont utilisés dans des réactions de réduction catalysées ou non par des bactéries. Dans beaucoup de piles à combustible microbiologiques, les électrons qui atteignent la cathode se combinent avec l'oxygène de l'air et les protons diffusant de l'anode à travers la membrane échangeuse de cations. Cette réaction cathodique présente de nombreux avantages. Le dioxygène est en effet disponible gratuitement et en grande quantité. De plus, le produit de sa réduction est non toxique puisqu'il s'agit le plus souvent de l'eau. L'inconvénient principal de ce comburant est que sa réduction est très difficile sur les matériaux d'électrode classiques et nécessite donc un catalyseur. Dans les piles à combustible, ces catalyseurs peuvent être métalliques ou chimiques mais ils coûtent chers et doivent être remplacés régulièrement. C'est pourquoi le développement de biocathodes microbiennes réduisant le dioxygène est devenu récemment un axe de recherche très dynamique et à fort enjeu dans le domaine de la microbioélectrochimie. Dans beaucoup de piles à combustible microbiologiques étudiées en laboratoire de recherche, les réactions de réduction utilisent des oxydants chimiques forts, tels que le ferricyanure. Ils assurent une cathode non limitante permettant une caractérisation plus facile des phénomènes anodiques. Ces cathodes de laboratoire ne sont pas envisagées dans des configurations de piles à grande échelle car elles sont toxiques, non durables et doivent être remplacées régulièrement.

Au-delà de la production d'électricité, une autre application des piles à combustible microbiologiques a été développée et étudiée. Cette seconde application résulte des réactions d'oxydation catalysées à l'anode qui peuvent aussi être exploitées dans l'épuration d'eaux contaminées par des polluants organiques. Cette épuration de l'eau peut, de plus, être complétée par certaines réactions de réduction catalysées par des biofilms microbiens.

2.1.2 Application à la production d'électricité couplée au traitement des eaux usées

A l'anode, les réactions d'oxydation catalysées par les microorganismes sont très similaires à l'étape principale du procédé classique de traitement des eaux usées appelé procédé des boues activées.

Traitement classique des eaux usées par le procédé des boues activées

Dans une station d'épuration basique, le procédé des boues activées employé et connu internationalement a pour but la dégradation de la pollution dite organique, c'est-à-dire la pollution due à la présence de glucides, protéines ou lipides rejetées par les particuliers, les industries, et les eaux de ruissellement. Son fonctionnement est schématisé ci-dessous.

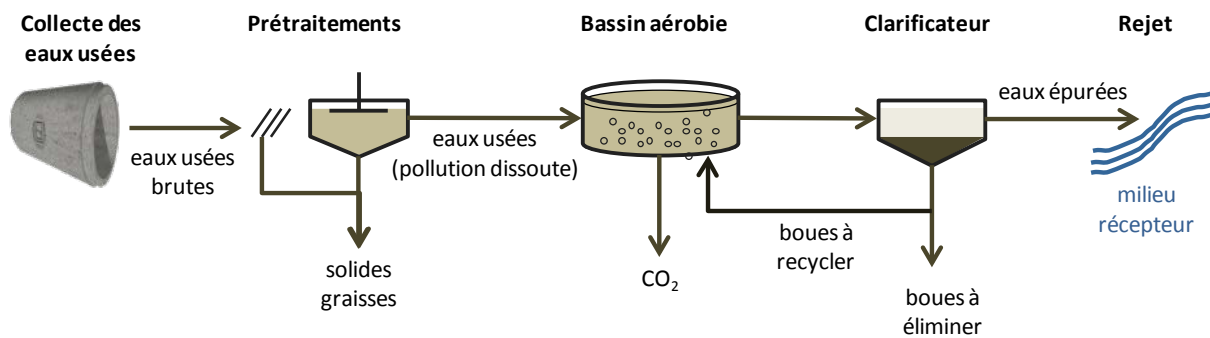


Figure 14 Schéma d'une station d'épuration utilisant un procédé de boues activées conventionnel

La station d'épuration se situe à l'extrémité d'un réseau de collecte et recueille en continu ces eaux usées. Après avoir subi des prétraitements visant à éliminer les éléments solides les plus grossiers qui sont susceptibles de gêner les traitements ultérieurs ou d'endommager les équipements, les eaux polluées sont acheminées vers un bassin aéré où elles vont subir des traitements permettant l'élimination de la pollution encore dissoute ou en suspension. Cette étape constitue le cœur des procédés et à l'instar des procédés anodiques, il repose sur l'oxydation des composés organiques grâce à la respiration bactérienne. Cette pollution organique constitue la majorité de la pollution des eaux usées. Le bassin d'aération est un réacteur biologique où la respiration des microorganismes est activée par une diffusion et un bullage d'air important. La diffusion de l'oxygène est l'un des enjeux majeurs du procédé des boues activées car il permet une oxydation efficace et rapide de la pollution mais il constitue aussi le coût principal du procédé. Cette pollution est en partie transformée en CO₂ et en partie assimilée par les microorganismes qui se multiplient. Dans le procédé à boues activées, les principaux microorganismes impliqués dans la dégradation de la pollution sont les bactéries et les protozoaires d'espèces très diverses et en interaction complexe. Ces microorganismes sont en suspension dans l'eau et s'associent naturellement sous la forme de flocules, qu'on appelle les boues activées. Une fois que la pollution organique a été dégradée, l'eau épurée doit être séparée des microorganismes avant d'être rejetée dans le milieu naturel. Cette séparation se fait par décantation dans un second bassin appelé clarificateur. Les flocules de microorganismes sont

recupérés au fond du clarificateur. Une partie des flocules est éliminée tandis qu'une autre est recyclée vers le bassin d'aération afin de maintenir la concentration en microorganismes en contact avec la pollution. Comme la pollution qui constitue finalement le substrat de croissance des bactéries arrive de façon continue dans le réacteur, les microorganismes se reproduisent en permanence. Si on n'éliminait pas une partie des bactéries, elles atteindraient des concentrations excessives dans le bassin d'aération. Ceci pourrait surcharger le clarificateur où les flocules ne pourraient pas être suffisamment séparés de l'eau traitée et dégraderait alors la qualité de l'effluent. Afin de maintenir l'équilibre, il est nécessaire d'éliminer autant de microorganismes que ce qui a été produit. Ces microorganismes éliminés sont appelés boues en excès et sont dirigés vers une filière de traitement dédiée.

Traitement d'eaux usées à l'anode de piles à combustible microbiologique

A l'anode des systèmes microbioélectrochimiques, des phénomènes similaires sont à l'œuvre, ce qui peut permettre de coupler la production d'électricité à l'épuration d'eaux usées polluées par des composés organiques. Plusieurs avantages découlent de l'épuration anodique comparé au procédé des boues activées. Tout d'abord, la dépollution ne requiert pas d'aération ce qui supprime un coût de fonctionnement conséquent du procédé dû à l'énergie électrique dépensée pour cette aération. Au contraire, de l'électricité est produite durant le procédé de dépollution de l'eau. En outre, les bactéries employées dans l'épuration ne sont pas en suspension dans l'effluent à traiter mais elles adhèrent à un support (l'anode). Cette caractéristique permet de supprimer l'étape de décantation qui est indispensable dans le système des boues activées. Enfin, un avantage considérable est que les bioanodes sont capables d'oxyder une pollution organique en concentration faible (Pant et al. 2012, Kim et al. 2010, Rozendal et al. 2008) par rapport aux procédés des boues activées. Il est donc possible d'utiliser ces procédés d'oxydation bioanodiques en association avec d'autres procédés de traitement, afin d'obtenir une dépollution plus complète de l'eau.

Les piles à combustible microbiologiques de laboratoire ont permis de délivrer des densités de courant de l'ordre de la dizaine d'Ampères par m^2 d'anode (Lapinsonnière et al. 2012). Il a été calculé que ce courant correspond à une capacité de traitement des eaux usées de 7.1 kg de Demande Chimique en Oxygène (DCO) par m^3 de réacteur et par jour (Rozendal et al. 2010). Cette capacité est comparable aux performances des systèmes conventionnels de boues activées. Cependant, les expériences réalisées pour construire des pilotes industriels de piles à combustible microbiologiques montrent des performances très faibles lorsque les volumes

anodiques dépassent plusieurs litres (Liu et al. 2008). Ces pertes de performances sur les pilotes à grande échelle mettent en évidence l'existence de pertes d'efficacité et de pertes d'énergies qu'il convient encore de minimiser afin de rendre la technologie des piles à combustibles plus performante. Ces pertes d'énergies sont très étudiées et nous les détaillerons dans la partie 3 suivante.

Un autre avantage des piles à combustible microbiologiques est la séparation des réactions d'oxydation et de réduction dans deux compartiments distincts. Cette séparation ainsi que la diversité des réactions qui peuvent être catalysées par des microorganismes à la cathode permet d'envisager d'autres procédés de traitements de pollutions spécifiques à la cathode.

Traitement d'eaux usées à la cathode de piles à combustible microbiologique

Comme discuté précédemment, les réactions de réduction qui peuvent être catalysées par des bactéries à la cathode sont multiples. Parmi ces réactions, beaucoup ont une application dans la dépollution d'espèces chimiques très toxiques ou difficiles à éliminer par des méthodes conventionnelles. On peut citer par exemple la déchlorination de trichloroéthène toxique en éthène inoffensif (Aulenta et al. 2007, 2009, 2010, Strycharz et al. 2008) ou encore la réduction de U(VI) soluble en U(IV) insoluble et donc facile à séparer de l'eau. Ces deux exemples de bioremédiation cathodique ont été testés sur des demi-piles, sans être couplées à une bioanode. D'autres réactions de dépollution cathodiques ont été testées sur des piles à combustible entières, c'est-à-dire en fonctionnant avec une anode biologique.

Une telle réaction très étudiée est la réduction des nitrates ou des nitrites en diazote par des bactéries électroactives dénitrifiantes. Plusieurs groupes de recherche ont ainsi mis en évidence qu'il était possible d'effectuer simultanément une dépollution organique à la bioanode et une dénitrification à la biocathode (Lefebvre et al. 2008, Virdis et al. 2008, 2009, 2010, Puig et al. 2011). Dans les eaux usées, la pollution azotée provient des nitrates et des nitrites, mais aussi de l'ammoniac ou de composés organiques azotés. Le traitement des eaux usées par le procédé des boues activées seul n'est pas adapté au traitement de la pollution azotée et après traitement dans le bassin d'aération, il peut subsister de forte concentration en ammoniac et en oxydes d'azote. Lorsque les eaux usées ont une forte concentration en pollution azotée, des unités de traitement spécifiques doivent être mises en place. La réglementation concernant les taux d'azote autorisés à être rejetés dans le milieu naturel par les stations d'épuration est de plus en plus sévère et les traitements de la pollution azotée deviennent nécessaires. Or, le traitement de

ce type de pollution en station d'épuration est complexe car il requiert plusieurs communautés bactériennes dont les exigences métaboliques peuvent être incompatibles. Viridis et al. (2010) ont mis au point une pile à combustible microbiologique permettant de traiter une eau usée modèle, contenant un polluant organique sous la forme d'acétate et un polluant azoté sous la forme d'ammoniac (voir le schéma ci-dessous).

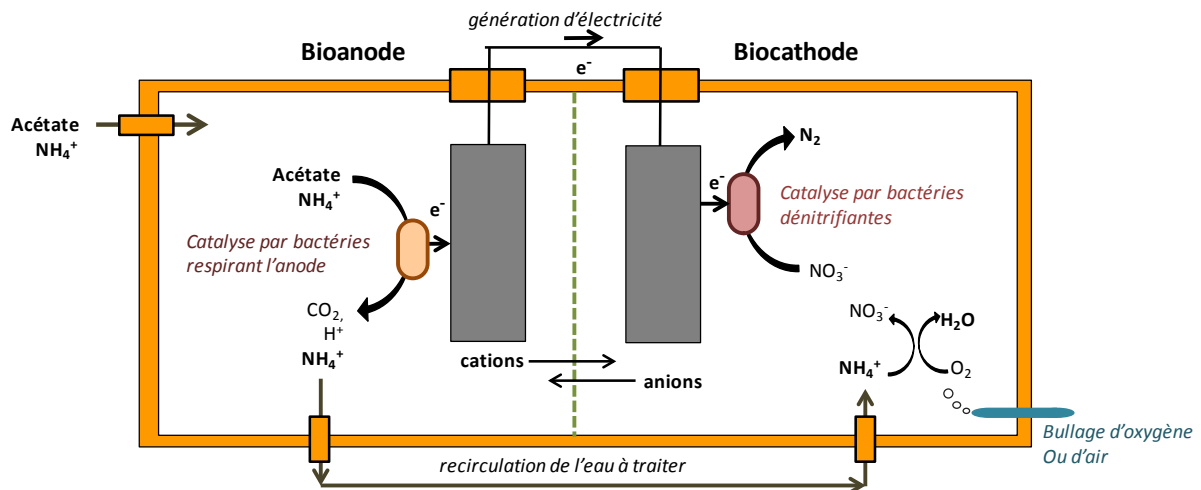


Figure 15 Schéma du dispositif proposé par Viridis et al. (2010)

Cette eau usée modèle subit d'abord une oxydation à la bioanode permettant d'éliminer la pollution organique à près de 100%. L'eau usée modèle est ensuite acheminée vers la cathode où elle est aérée de façon contrôlée afin que l'ammoniac soit oxydé en nitrates. Les nitrates sont alors traités par les bactéries dénitrifiantes en biofilm sur la cathode et sont transformés en diazote. Les auteurs montrent que l'efficacité du traitement cathodique peut être optimisée par la concentration en oxygène dissous dans la cathode. Une concentration de dioxygène trop faible conduit à une oxydation faible de l'ammonium en nitrates tandis qu'une concentration trop importante inhibe l'activité de la biocathode dénitrifiante. Ces résultats semblent particulièrement intéressants car la configuration étudiée permet une dépollution efficace à près de 80 % même lorsque le rapport pollution carbonée/pollution azotée est faible, ce qui se révèle très délicat à réaliser en employant les traitements conventionnels.

2.1.3 Conclusion et transition

Historiquement, les systèmes microbioélectrochimiques ont été étudiés sous la forme de piles à combustible microbienne permettant de délivrer un courant électrique tout en dégradant des polluants organiques à la bioanode. En effet, bien que l'association entre bactéries et une

électrode ait été découverte en 1911 par M. C. Potter, l'intérêt pour les systèmes microbioélectrochimiques a été renouvelé dans les années 1960 par des chercheurs américains de la NASA afin de développer une technologie permettant la production d'électricité à partir des déchets produits par les astronautes en mission dans l'espace. En réalité, ce n'est que depuis les années 2000, que ce domaine de recherche s'est véritablement développé. Les études ont permis d'améliorer la compréhension des phénomènes ainsi que les performances des piles à combustibles microbiennes, bien que beaucoup de limites des systèmes n'aient pas encore été complètement comprises et dépassées. Avec du recul, beaucoup de chercheurs du domaine tendent à montrer que l'application principale des piles à combustible microbiologiques n'est pas tant la production d'électricité à grande échelle que la dépollution. En effet, de plus en plus d'applications des piles pour la bioremédiation de polluants dangereux et récalcitrants sont découvertes. Dès lors, on peut ainsi envisager l'utilisation des piles dans des applications de niches, principalement pour traiter des pollutions spécifiques ou alors alimenter des appareils consommant très peu d'énergie. Quelques études ont démontré la possibilité d'utiliser des piles à combustible microbiennes facile à mettre en place en milieu naturel. On peut citer par exemple, l'étude de piles à combustible microbiologique permettant d'alimenter des appareils météorologiques pendant plusieurs mois (Tender et al. 2008), ou l'étude par notre équipe (Thomas et al. 2013) d'un système d'émission de signaux radio potentiellement applicable à la transmission de données enregistrées par des capteurs placés en rivière.

La recherche dans les systèmes microbioélectrochimiques tend aussi à privilégier les configurations de type pile à électrosynthèse microbienne, dont le potentiel économique semblent très prometteur. En effet, l'électricité n'est actuellement pas coûteuse. La revente éventuelle de l'électricité produite par les piles à combustible microbiologiques rapporterait donc peu de bénéfices. Dans les électrolyseurs microbiens, dont le principe de fonctionnement est explicité dans le paragraphe suivant, l'électricité peu onéreuse est investie dans le procédé et sert à la génération de produits chimiques à forte valeur ajoutée.

2.2 Fonctionnement et application des électrolyseurs microbiens

Contrairement aux piles à combustible microbiennes, les électrolyseurs microbiens ne sont pas galvanostatiques, c'est-à-dire qu'ils ne délivrent pas d'électricité mais en exploitent l'énergie pour produire des composés à haute valeur ajoutée. L'intérêt de délivrer une puissance électrique à un système microbioélectrochimique est qu'il est possible de produire de façon

spécifique et relativement pure une grande variété de composés chimiques. Le potentiel économique de tels dispositifs serait supérieur à celui des piles à combustible microbiologiques car il permet d'investir un courant électrique peu coûteux et en petite quantité, et le convertir en composés rentables et donc d'en retirer une plus-value. La génération des produits à valeur ajoutée se fait à la cathode par catalyse microbienne ou abiotique (voir figure ci-dessous). À l'anode, les électrons sont fournis par la catalyse microbienne de l'oxydation de composés organiques (eaux usées, acétate). L'utilisation d'une bioanode permet en effet de minimiser la différence de potentiel entre l'anode et la cathode et donc de minimiser l'énergie à investir dans le système pour la production cathodique. Quelques exemples sont illustrés en **Figure 16** suivante

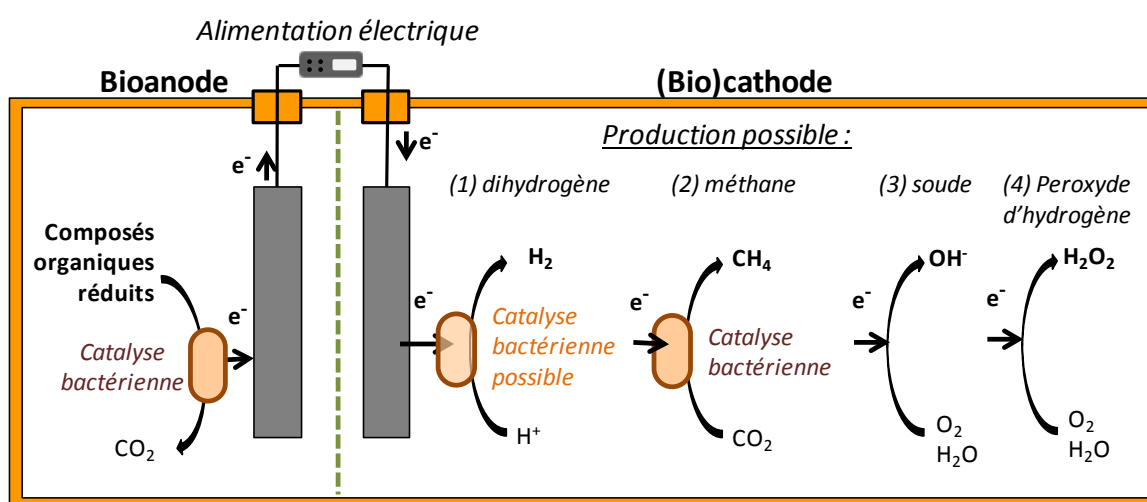


Figure 16 Schéma du fonctionnement des électrolyseurs microbiens et de la production cathodique possible

Ces procédés de réductions cathodiques ont par exemple permis de générer (1) du dihydrogène par catalyse avec du platine (Logan et al. 2008) ou des microorganismes (Rozendal et al. 2008) ou (2) du méthane par catalyse, notamment avec des bactéries utilisant un transfert direct des électrons fournis par la cathode (Cheng et al. 2009, Villano et al. 2010). On peut également citer la génération abiotique de (3) soude (Rabaey et al. 2010) ou encore la génération abiotique de (4) peroxyde d'hydrogène (Rozendal et al. 2009) due à la réduction incomplète du dioxygène sur une cathode dépourvue de catalyseurs. Des produits organiques plus complexes peuvent aussi être générés à la biocathode de telles piles (Rabaey et Rozendal 2010) et on parle alors d'électrosynthétiseurs microbiens. Un schéma de ce dispositif est donné en **Figure 17**, ci-dessous.

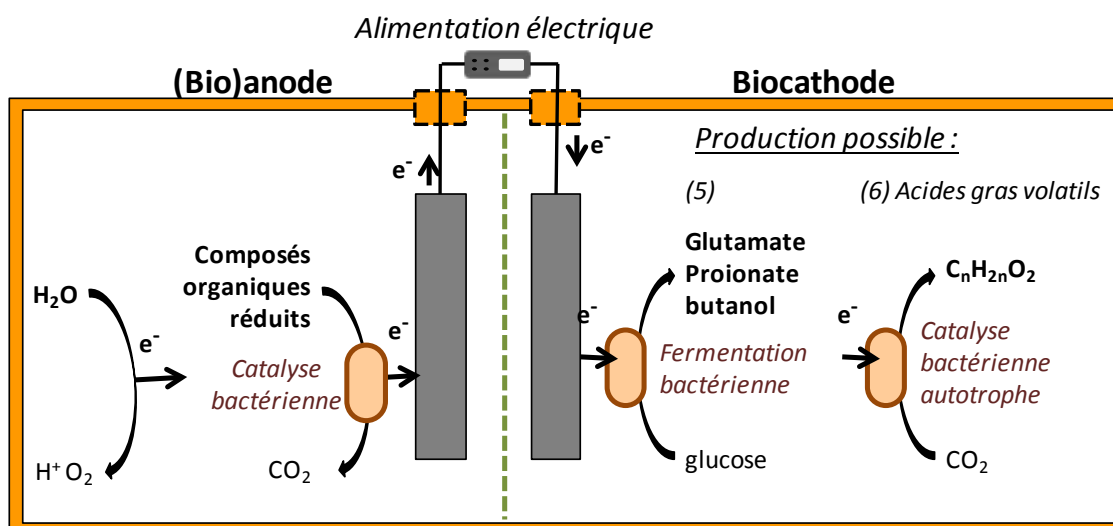


Figure 17 Schéma du fonctionnement d'un électrosynthétiseur microbien particulier : l'électrosynthétiseur microbien

Dans les électrosynthétiseurs microbiens, l'anode peut être microbienne mais la plupart des études a été réalisée avec une anode abiotique utilisant l'oxydation de l'eau. A la cathode, les électrons délivrés peuvent soit (5) orienter des fermentations bactériennes du glucose en glutamate, propionate ou encore butanol (Kim et Kim 1988), soit (6) permettre la réduction microbienne de CO_2 en acides gras volatils. Cette dernière forme d'électrosynthèse microbienne a été découverte et développée par Nevin et al. (2010). Dans les travaux publiés, des microorganismes de l'espèce acétogène *Sporomusa ovata* sont tout d'abord cultivées en utilisant le dihydrogène comme donneur d'électrons puis la cathode sert de seul donneur d'électrons. La seule source de carbone fournie est du CO_2 . Un biofilm fin de *S. ovata* se développe à la cathode et on constate une production d'acétate et de 2-oxobutyrate couplée à une consommation de courant électrique. L'efficacité faradique de cette production (charge liée à la génération des deux composés par rapport à la charge consommée par le biofilm) est de 86 % en moyenne. La plupart des électrons fournis à la cathode est utilisée pour la production d'acétate et d'oxobutyrate et non pour la reproduction microbienne. Le procédé semble durable car il a fonctionné pendant 3 mois avec un biofilm composé majoritairement de microorganismes vivants même en fin d'expérience. Ces procédés d'électrosynthèse microbienne ont été évalués sur diverses espèces de microbiennes acétogènes et les études ont montré que l'efficacité des conversions dépend des espèces utilisées (Nevin et al. 2011). Les mécanismes liés à la réduction du CO_2 en acides gras volatils par les biocathodes ne sont pas élucidés et demanderaient que des analyses génomiques soient conduites. Il est possible que les voies métaboliques fassent intervenir les cycles connus de production de composés organiques à

partir de CO_2 , soit les cycles de Wood-Ljungdahl ou de Calvin-Benson, on encore le cycle inverse de Krebs.

Un avantage supplémentaire et éventuel de cette nouvelle voie de biosynthèse microbienne est qu'elle pourrait évoluer vers la production de composés beaucoup plus complexes grâce à l'utilisation de l'ingénierie génétique. En effet, l'analyse des produits générés par les bactéries suggère que les voies métaboliques employées font intervenir un intermédiaire biologique essentiel, l'acétyl coenzyme A. L'utilisation de la modification génétique permettrait de créer des voies de production de composés très diverses à partir de cet intermédiaire (Lovley 2010). Une autre particularité de cette voie de synthèse microbienne est qu'on peut l'alimenter par un courant électrique produit par des panneaux photovoltaïques et on crée ainsi une nouvelle forme de photosynthèse (Nevin et al. 2010). Cette photosynthèse artificielle présente de nombreux avantages par rapport à la photosynthèse conventionnelle qui permet de produire des composés organiques sous forme de biomasse végétale. En effet, la capture de l'énergie solaire par des systèmes photovoltaïques présente une efficacité élevée, comprise entre 10 et 25 % (Grätzel 2001) contre moins de 5% pour les systèmes photosynthétiques des êtres vivants (Zhu et al. 2008). De plus, il n'y a pas besoin de vastes terrains arables ni de pesticides. Le réactif de départ de ces biosynthèses est le CO_2 , un gaz rejeté en excès à cause de l'activité humaine et dont on cherche à faire baisser la quantité dans l'atmosphère. Enfin, les composés générés par les microorganismes cathodiques sont directement disponibles et ne requièrent que peu de procédés de purification et d'extraction, contrairement à la biomasse végétale.

Un inconvénient principal de ce type de dispositif est lié au métabolisme particulier des microorganismes associés à la cathode. Ces microorganismes sont autotrophes pour le carbone, c'est-à-dire que la source de carbone utilisée pour sa croissance est inorganique (CO_2). Les réactions de synthèse des composés intracellulaires à partir de CO_2 consomment beaucoup d'énergie et sont lentes. Ces réactions étant nécessaires à la reproduction microbienne, on constate que les bactéries autotrophes se multiplient très lentement. Or, un fonctionnement optimal de la pile à électrosynthèse microbienne requiert la présence en grande quantité de bactéries à la cathode. Une solution avancée pour contourner ce problème serait d'utiliser des microorganismes hétérotrophes pour le carbone (Rabaey et al. 2011) qui utilisent des composés organiques comme source de carbone. Dans ce cas, les microorganismes cathodiques génèrent des composés chimiques à la cathode non pas à partir de CO_2 mais à partir de composés organiques de type acides gras volatils. Dans ce cas, cependant, le risque est que les bactéries ne

s'orientent pas vers la production de composés chimiques mais utilisent l'énergie fournie pour leur reproduction. L'idéal serait donc d'associer les deux types de métabolisme, avec une phase de fonctionnement hétérotrophe afin d'assurer une multiplication rapide des microorganismes sur la biocathode puis un fonctionnement autotrophe avec une production de composés à forte valeur ajoutée à partir de CO_2 .

2.3 Transition de la partie 2

Les applications présentées ici montrent des possibilités d'utilisation des systèmes microbioélectrochimiques dans des domaines variés comme la dépollution et la bioremédiation ou encore la production de composés chimiques. Actuellement, les systèmes étudiés sont des systèmes de laboratoire à petite échelle et le passage à des dispositifs industriels fonctionnels n'est pas encore envisageable car les performances des systèmes microbioélectrochimiques sont encore trop faibles. L'amélioration des performances passe tout d'abord par la compréhension de l'ensemble des limites et des pertes des systèmes, présentées en partie 3 suivante.

3 Limites des systèmes microbioélectrochimiques et liens avec les travaux présentés dans ce mémoire

L'énergie qui peut être libérée d'une réaction redox (cas de la pile galvanostatique) ou l'énergie qui est nécessaire pour accomplir une réaction redox (cas de l'électrolyseur) est liée à la différence de potentiel thermodynamique ΔE_{th} du système électrochimique. Cette force correspond à la différence entre les potentiels standards de l'anode et de la cathode. Dans un cas idéal, cette différence de potentiels peut être mesurée en circuit ouvert, c'est-à-dire sans passage de courant électrique entre l'anode et la cathode. En réalité, la différence de potentiel effectivement mesurée est différente de la ΔE_{th} calculée du système, car il existe un certain nombre de pertes η_i survenant à l'anode et à la cathode et limitant les performances des systèmes. A courant nul, la baisse de potentiel du système est liée à une perte thermodynamique. Lorsque le système électrochimique est en fonctionnement, on constate que la différence de potentiel entre l'anode et la cathode s'éloigne encore plus de la valeur théorique ΔE_{th} en fonction du courant circulant entre l'anode et la cathode. En effet, une majorité des pertes survenant dans un système électrochimique dépend des cinétiques des réactions et donc du courant du système. Ces pertes peuvent être observées dans le système par l'établissement d'une courbe de polarisation, établissant la différence de potentiel entre les

deux électrodes du système en fonction du courant parcouru (voir **Figure 18** ci-dessous, cas de la pile à combustible microbioélectrochimique).

La compréhension de ces surtensions et des limites des systèmes microbioélectrochimiques est indispensable pour pouvoir développer une pile commerciale et applicable à un procédé réel. On peut diviser ces surtensions en deux catégories, celles liées aux limites de fonctionnement du système électrochimique (en rouge sur le schéma ci-dessous) et celles liées aux catalyseurs (en vert sur le schéma ci-dessous).

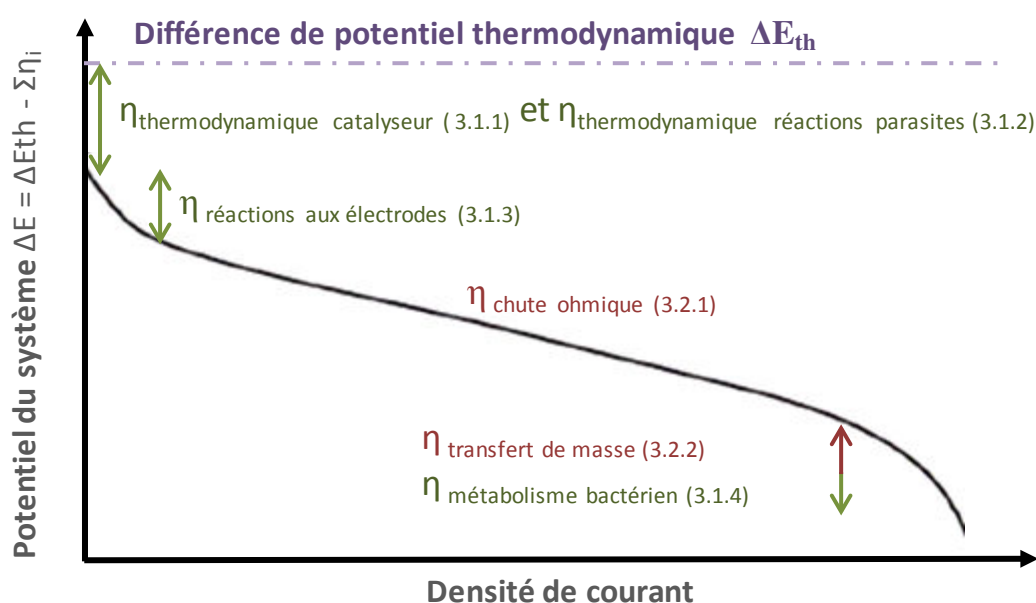


Figure 18 Schéma des surtensions survenant dans une pile à combustible microbienne sur une courbe de polarisation. Les paragraphes correspondant sont indiqués entre parenthèses

3.1 Pertes liées aux catalyseurs

De nombreuses limites de potentiels des systèmes microbioélectrochimiques dépendent des performances des catalyseurs aux électrodes. Ces limites sont liées 1) aux pertes thermodynamiques inhérentes aux catalyseurs, 2) à la présence de réactions secondaires, 3) aux surtensions des réactions à l'interface avec l'électrode et 4) aux limites liées aux transferts de masse à l'électrode.

3.1.1 Limites liées à la thermodynamique des réactions

La perte d'énergie thermodynamique des systèmes microbioélectrochimiques est liée à la présence d'un catalyseur des réactions à l'électrode. Dans le cas d'une cathode par exemple, le potentiel de ce catalyseur est inférieur au potentiel standard du substrat, ce qui constitue une

perte thermodynamique faible mais inévitable. Une autre perte thermodynamique est liée au caractère vivant et métaboliquement actif des catalyseurs bactériens. Cette perte thermodynamique survient à cause de la dissipation d'une partie de l'énergie contenue dans les réactifs du système pour le maintien et la reproduction des bactéries électroactives, comme illustré par la **Figure 19** ci-dessous dans le cas d'une pile à combustible microbienne.

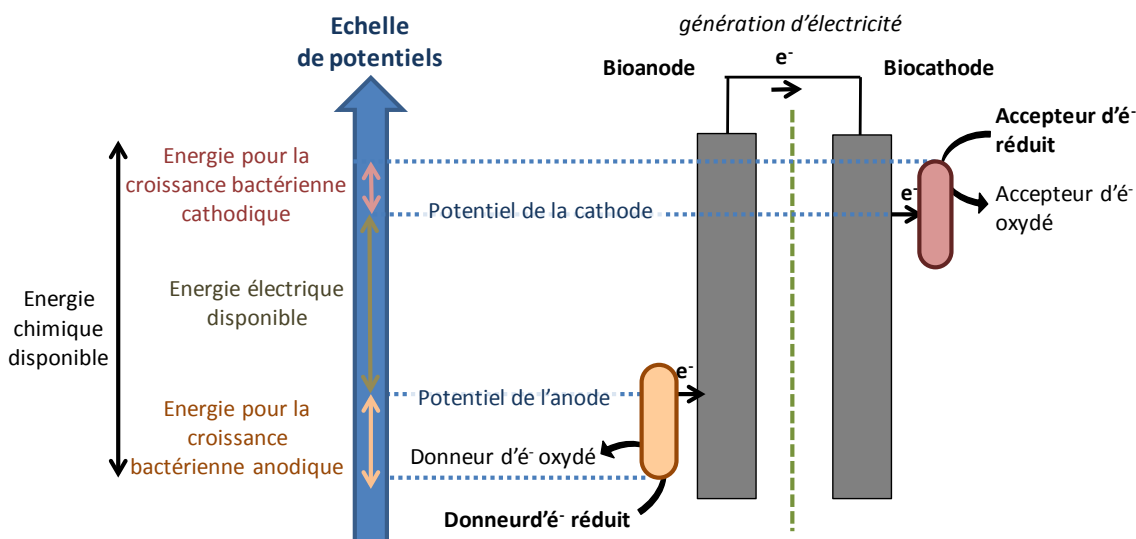


Figure 19 Schéma des pertes thermodynamiques liées au caractère vivant des catalyseurs, cas d'une pile à combustible microbiologique

Cette dissipation d'énergie est une perte nécessaire au développement d'un biofilm dense et actif permettant la génération d'un maximum de courant ou de produits. La quantité d'énergie dissipée est liée aux voies de transfert électroniques extracellulaires des bactéries et notamment aux potentiel des molécules redox employées pour les étapes ultimes (anode) / premières (cathode) de transfert avec l'électrode. En effet, à l'anode, les électrons sont transmis au système à un potentiel supérieur au potentiel redox du donneur d'électrons (substrat organique, par exemple). Ce potentiel supérieur correspond au potentiel de la molécule électroactive impliquée dans le transfert électronique hétérogène avec l'électrode, par exemple un cytochrome membranaire. A la cathode, les électrons fournis aux bactéries électroactives sont récupérées à un potentiel inférieur à celui de l'accepteur d'électrons (par exemple O_2) et correspond à la molécule redox jouant le rôle de porte d'entrée des cytochromes dans le métabolisme des bactéries cathodiques. La différence de potentiel entre les potentiel redox des donneurs/accepteurs d'électrons fournis au système et les potentiels redox des cytochromes impliqués dans le transfert extracellulaire des bactéries correspond en grande majorité à l'énergie récupérée par les bactéries sous la forme d'ATP et de pouvoir réducteur afin d'assurer

leur croissance (voir **Figure 19**). Pour les électrolyseurs microbiens, cette dissipation de l'énergie vers la croissance bactérienne a un enjeu particulier car cela peut signifier qu'au lieu de générer les produits à haute valeur ajoutée désirés, les microorganismes utilisent l'énergie pour se reproduire de façon excessive à la cathode.

Un moyen de minimiser cette perte serait de pouvoir connecter les bactéries à des potentiels les plus proches possibles des potentiels des donneurs d'électrons (anode) ou accepteurs d'électrons (cathode). Ceci pourrait être réalisé en sélectionnant les souches de bactéries ou encore en changeant les propriétés de surface des électrodes afin de favoriser la connexion de certains cytochromes en particulier.

3.1.2 Limites liées à la survenue de réactions parasites

Les réactions parasites peuvent être dues à la traversée des réactifs d'un compartiment à l'autre. Des réactions d'oxydo-réduction directes peuvent se produire entre donneurs et accepteur terminaux d'électrons sans génération d'électricité ce qui engendre une baisse d'efficacité faradique du système. Ces réactions parasites peuvent aussi entraîner la formation d'un potentiel mixte aux électrodes, ce qui augmente le potentiel à l'anode et baisse le potentiel à la cathode. La traversée des réactifs est limitée par la présence d'une membrane bien que celle-ci possède une certaine perméabilité aux réactifs fournis au système. La modification des propriétés de transfert des membranes permettrait de limiter encore plus la traversée de ces réactifs.

Les réactions parasites et la formation de potentiels mixtes peuvent aussi venir d'une catalyse peu performante des réactions entraînant une oxydation ou une réduction incomplète des réactifs du système. Un exemple classique de ce phénomène est la réduction du dioxygène à la cathode de piles à combustible microbiologique. Lorsque cette réduction est incomplète, on assiste non pas à la formation d'eau mais de peroxyde d'hydrogène. Le potentiel standard de cette réduction partielle est considérablement inférieur à celui de la réduction totale de l'oxygène en eau. De plus, dans ce cas, la production de peroxyde de d'hydrogène peut avoir un effet destructeur sur les biofilms.

3.1.3 Limites à l'interface avec l'électrode

Les surtensions d'interface de l'électrode dans un système microbioélectrochimiques sont liées à la cinétique des réactions de transfert électronique extracellulaire vers l'électrode pour

les biofilms anodiques et depuis l'électrode pour les biofilms cathodiques. La diminution des surtensions est liée à la quantité de microorganismes électroactifs connectés aux électrodes, à la vitesse de transfert des électrons de la réaction limitante dans la chaîne de transport des électrons ainsi qu'à l'activité métabolique du biofilm électroactif (Clauwaert et al. 2008). On peut améliorer ces aspects en sélectionnant une espèce ou un consortium bactérien extrêmement performant dans le transfert électronique extracellulaire. On peut aussi améliorer les propriétés de surface des électrodes afin d'augmenter l'attachement et la connexion des bactéries à l'électrode ce qui contribue à abaisser la surtension d'interface. Cette surtension peut être évaluée à faible courant, lorsque les transferts de masse sont négligeables (voir **Figure 18**).

3.1.4 Limites liées au transfert de masse et aux vitesses de métabolisation des bactéries

Dans les systèmes microbioélectrochimiques, les réactions d'oxydo-réduction d'un réactif suivent une cinétique semblable à celle des enzymes. Ces cinétiques sont limitées par le turn-over du substrat au niveau du site catalytique de l'enzyme. Pour un microorganisme entier, les cinétiques de la catalyse se résument à la vitesse globale du métabolisme. A fort courant, le métabolisme des bactéries électroactives n'est plus capable de fournir les espèces réduites ou oxydées au niveau des électrodes avec une vitesse suffisante, ce qui crée une limite. Les limites liées à la concentration des produits à l'électrode et les surtensions liées à la vitesse de métabolisation des bactéries ont donc la même allure (voir **Figure 18**).

Un moyen de minimiser ce type de perte est de comprendre le métabolisme des bactéries au sein du biofilm, notamment comment ce métabolisme est régulé. L'interaction entre différentes espèces au sein du biofilm doit aussi être étudiée car les interactions synergiques ou les interactions de compétition peuvent influencer l'activité métabolique et donc les vitesses des réactions catalytiques à l'électrode.

3.2 Limites liées aux paramètres de fonctionnement du système microbioélectrochimique

Ces limites opérationnelles regroupent la perte liée à la chute ohmique et la perte liée aux limites de diffusion à proximité de l'électrode. Ces pertes dépendent en grande partie du design de la pile, du régime de transfert de masse, de la concentration en substrat et du pH.

3.2.1 Chute ohmique

La chute ohmique est due à la résistance que présentent les matériaux d'électrodes, les connexions, l'électrolyte et la membrane à la circulation des charges (flux d'électrons et flux d'ions) dans le système. Cette résistance à la circulation des charges suit la loi d'Ohm et est donc proportionnelle au courant. On a donc $\eta_{ohm} = i \times R_{totale\ système}$.

Il existe plusieurs moyens de minimiser la résistance ohmique du système. On peut diminuer la résistance des matériaux au flux d'électrons en utilisant des matériaux très conducteurs. Un matériau idéal en termes de conductivité est le métal, mais son coût et les problèmes de corrosion font que le carbone reste le matériau privilégié malgré une conductivité 100 à 1000 fois inférieure (Clauwaert et al. 2008). Augmenter la conductivité des électrodes de carbone est une solution mais une amélioration à apporter serait aussi d'augmenter la conductivité des collecteurs de courant et les connexions des électrodes vers le circuit externe.

On peut aussi diminuer la résistance des piles en améliorant le transfert des ions. La résistance au transfert ionique dépend de la concentration en ions et de leur mobilité. On pourrait donc augmenter les concentrations en ions dans l'électrolyte. Or la survie et l'activité des bactéries dépendant de la concentration ionique milieu extracellulaire. Il est donc possible d'augmenter les concentrations en ions dans l'électrolyte sans excéder certaines limites pour ne pas nuire au fonctionnement du biofilm. Par ailleurs, il est difficilement envisageable d'utiliser ce moyen dans le cadre d'une application dans les eaux usées. Cela signifierait en effet, d'ajouter des sels dans l'eau à traiter, sels qui devraient ensuite être éliminés par des procédés coûteux avant le rejet de l'eau épurée dans le milieu naturel. Un obstacle important au transfert ionique est la présence d'une membrane échangeuse d'ions qui séparent les compartiments anodiques et cathodiques. Cette membrane est cependant importante car elle évite aux réactifs des deux compartiments de réagir sans produire de l'électricité. L'amélioration des propriétés des membranes est un des axes de recherche important des systèmes microbioélectrochimiques car il a des implications sur le transport des ions mais aussi sur l'établissement de gradient de pH, comme nous le verrons plus loin. Enfin, un moyen de réduire la résistance au transfert d'ions est de diminuer la distance parcourue par les ions. On constate ainsi que pour les piles de petite taille, les densités de puissance sont élevées et reliées à de faibles chutes ohmiques car la durée de diffusion des ions ainsi que la distance qu'ils parcourent sont faibles. Le design des piles ainsi que le choix des matériaux d'électrodes peut aider à minimiser cette distance. De meilleures performances ont été constatées lorsque la pile comporte une anode, une membrane et une

cathode proches, en vis-à-vis et avec la même surface projetée, comme illustré par le schéma ci-dessous.

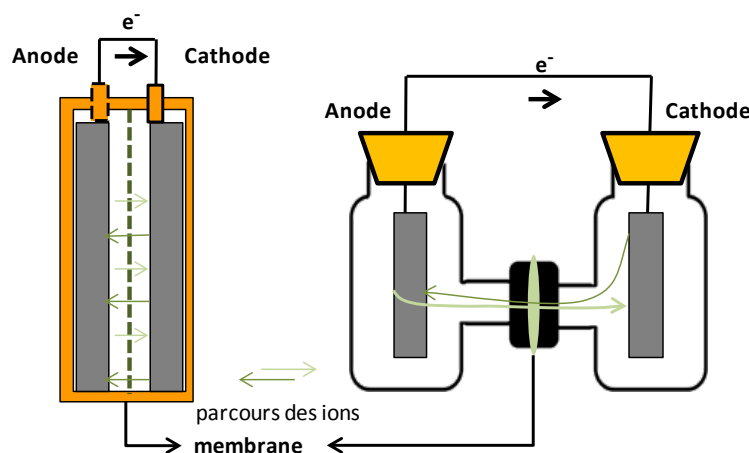


Figure 20 Schéma de la distance parcourue par les ions dans des piles au design différents, une pile au design optimisée (gauche) avec résistance interne de l'ordre de quelques Ω et une pile en H (droite) avec une résistance interne supérieure à 300 Ω

Un moyen de minimiser la distance de parcours des ions est aussi d'utiliser des électrodes poreuses plutôt que des électrodes pleines. En effet pour les électrodes pleines, la distance parcourue par les ions peut être considérablement rallongée suivant la face de l'électrode où la réaction se produit.

3.2.2 Limite liée à la concentration des réactifs et des produits à l'électrode

Cette limite est liée à l'épuisement des réactifs à proximité de l'électrode et à l'accumulation des produits issus de la réaction lorsque le courant est élevé. Dans les systèmes microbiologiques qui fonctionnent à pH neutre et dans des solutions de concentrations ioniques faibles, ces pertes sont aussi liées à la mise en place de gradient de pH dans les compartiments anodiques et cathodiques des piles. A l'anode, les réactions d'oxydation produisent des protons ce qui acidifie le milieu et créer un gradient dans le biofilm si les protons ne sont pas évacués rapidement. A la cathode, les réactions peuvent produire des ions hydroxyde ou consommer des protons et ainsi rendre le catholyte et le biofilm plus basique. Ces deux phénomènes peuvent nuire à l'activité des biofilms dont le fonctionnement optimal se déroule à un pH autour de 7. De plus, ces variations de pH entraînent une augmentation du potentiel anodique et une baisse identique du potentiel cathodique. Ces variations de pH dans les compartiments d'une pile peuvent donc entraîner des baisses significatives du potentiel des piles. Or, le transport de ces ions responsables des gradients de pH à travers la membrane échangeuse d'ions des piles

représente un véritable problème. Dans les conditions d'utilisation des piles (pH neutre), ces membranes transportent en majorité des ions autres que les protons et les hydroxydes.

Un moyen de réduire ces pertes est tout d'abord de garantir un transfert suffisant des réactifs vers le biofilm et des produits hors du biofilms. Cela peut être fait en introduisant une agitation mécanique des solutions par exemple. Une agitation représente en revanche un coût de fonctionnement supplémentaire. La circulation des métabolites depuis et vers l'électrode peut aussi être améliorée en influençant la structure du biofilm et sa perméabilité, notamment la perméabilité de la matrice extracellulaire entourant les biofilms. Le problème des gradients de pH peut être amélioré en augmentant le pouvoir tampon des solutions bien que cela implique l'ajout de sels dans l'électrolyte et les inconvénients cités plus haut, lorsque l'on veut traiter des eaux usées par exemple. Les problèmes de pH peuvent être aussi résolus par l'amélioration des membranes échangeuse d'ions. Certains chercheurs ont proposé de la supprimer ou d'installer une voie de recirculation de l'anolyte vers le catholyte. Le problème est alors la mise en contact directe des oxydants et des réducteurs du système qui pourraient réagir sans générer d'électricité. Cette absence de membrane est particulièrement délicate à gérer lorsqu'on utilise des microorganismes car leurs paramètres de fonctionnement peuvent être incompatibles avec un mélange des électrolytes entre compartiments. Un moyen idéal serait donc de maintenir la présence d'une membrane échangeuse d'ions mais d'en augmenter la sélectivité vis-à-vis des protons et des hydroxydes (Hamelers et al. 2010). Des travaux préliminaires de notre équipe ont par exemple montré qu'il est possible de modifier des membranes en polyethersulfone par greffage covalent de sels d'aryle diazonium et d'en moduler ainsi la sélectivité vis-à-vis de la filtration d'ions (Picot et al. 2012, Szymczyk et al. 2013)

3.3 Implication des limites évoquées avec les études entreprises durant ce travail de thèse

Un certain nombre de limites des systèmes microbioélectrochimiques a été mis en évidence en étudiant les dispositifs de laboratoire. Ces limites détectées dans des systèmes contrôlés occasionnent des pertes de performances qui risquent de nuire à l'efficacité du système lors d'une adaptation industrielle à grande échelle et dans des conditions moins idéales.

Une partie de ce travail de thèse a été consacrée à l'application des piles en tant que moyen de traiter des eaux usées tout en produisant de l'électricité. Les eaux usées contiennent diverses molécules à oxyder et dont la composition peut changer au cours du temps. Or, les bactéries

électroactives génèrent de l'électricité à partir d'un nombre de substrats limités (le plus souvent à partir d'acides gras volatils). L'oxydation des composés plus complexes typiquement contenues dans les eaux usées requiert le concours de plusieurs espèces de microorganismes qui peuvent se développer sur les biofilms anodiques mais aussi en suspension dans l'anolyte. On peut imaginer que ces cascades de réactions intervenant entre plusieurs espèces bactériennes peuvent avoir des conséquences sur les transferts de masse à la bioanode. La prolifération non contrôlée d'espèces microbienne en solution peut aussi avoir des conséquences négatives sur l'efficacité du système. Comprendre comment la bioanode s'adapte ou non à des substrats différents est donc essentiel afin envisager les types de pollution sur lesquels les piles à combustibles peuvent intervenir. Le **Chapitre 2** suivant est consacré à l'étude de cette adaptation des piles face à des changements de substrats. Il s'agit d'études réalisées avec une perspective technologique des piles à combustible, afin de tester l'applicabilité des biofilms dans l'épuration d'eaux usées. Le changement de substrats a été réalisé en prenant trois molécules modèles de complexité croissante : l'acétate non fermentescible, le glucose fermentescible qui est un monosaccharide et le lactose fermentescible qui est un disaccharide. L'adaptation aux différents substrats a été étudiée en fonction de la maturité des biofilms et en fonction de la fréquence du changement de l'anolyte à épurer.

Une autre grande partie de cette thèse a été consacrée à la modification de surface en vue d'améliorer la connexion des bactéries électroactives sur les électrodes. En effet, l'interface entre les bactéries et l'électrode influence le temps de formation du biofilm, la quantité de microorganismes attachés ainsi que leur connexion électrique. La technique de modification de surface utilisée pendant nos études est le greffage covalent par réduction de sels d'aryle diazonium. Cette méthode consiste à introduire de façon covalente des fonctionnalités spécifiques sur la surface de l'électrode. L'effet des fonctionnalités introduites est testé sur le développement et les performances de biofilms électroactifs par comparaison avec des électrodes non modifiées. Les modifications testées jusqu'ici montrent qu'il est possible d'améliorer l'affinité globale de la surface des électrodes afin d'augmenter la colonisation par les bactéries électroactives. Ainsi, le **Chapitre 3** a été consacré à une stratégie de modification d'anodes inédite dont le but recherché est d'augmenter l'affinité des bactéries pour la surface de l'anode en greffant une molécule connue pour réagir de façon spécifique avec un composant des membranes bactériennes. La fonctionnalité testée est l'acide boronique qui est capable de se complexer avec des glucides des membranes externes des bactéries.

Cette étude de fonctionnalisation de surface par des acides boroniques a été ensuite développée sur un nouveau matériau d'électrode : un film de nanotubes de carbone multi-parois déposé sur graphite. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Alan le Goff (Université Joseph Fourier, Grenoble). La fonctionnalisation du film de nanotubes de carbone et son effet sur les performances de bioanodes ont été étudiés. Les premiers résultats de cette collaboration font l'objet d'un bref **Chapitre 4**.

Enfin, ce travail de thèse a permis d'aborder les problématiques nouvelles des réactions cathodiques et de leur application dans les piles à combustible microbiologiques et dans les électrolyseurs microbiens. La formation et le fonctionnement des biofilms cathodiques sont encore peu documentés mais un des enjeux principaux de leurs performances est aussi la connexion efficace à une électrode. La modification de surface des cathodes est un moyen d'améliorer cette connexion. Le **Chapitre 5** concerne l'étude de modifications de surface en vue d'améliorer l'adhésion de deux types de biofilms cathodiques, des biofilms catalysant la réduction du dioxygène dans des piles à combustible microbiologiques et des biofilms catalysant la réduction de CO₂ en acides organiques dans des électrolyseurs microbiens. Pour les biofilms cathodiques, l'effet de modification de surface est encore très peu étudié. Pour les cathodes de piles à combustibles microbiologiques, la rareté des études provient de la difficulté à former les biofilms cathodiques et de leur fragilité. Dans le cas des biocathodes de électrolyseurs microbiens, il existe peu de données sur l'influence des propriétés de surface de la cathode car la découverte de la technologie est plus très récente (Nevin et al., 2010). Nos travaux font donc partie des études pionnières et les fonctionnalités chimiques que nous avons décidé d'étudier sur ces cathodes ont été choisies car elles sont connues pour améliorer les performances de biofilm à l'anode. La partie de l'étude concernant les électrolyseurs microbiens a été réalisée en collaboration avec le laboratoire LabMet de Gand, dans le cadre du Projet Hubert Curien Tournesol (Ministère des affaires étrangères).

Références du Chapitre 1

A

Aulenta F., Reale P., Canosa A., Rosetti S., Panero S., Marjone M.
Biosensors and Bioelectronics **25**, 2010, 1796-1802
"Characterization of an electro-active biocathode capable of dechlorinating trichloroethene and cis-dichloroethene to ethene"

Arechederra R. L., Minteer S. D.
Fuel cells **9**, 2008, 63-69
"Complete oxidation of glycerol in an enzymatic biofuel cell"

B

Bond D. R., Holmes D. E., Tender L. M., Lovley D. R.
Science **295**, 2002, 483-485
"Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments"

Bond D. R., Lovley D. R.
Applied Environmental Microbiology **69**, 2003, 1548-1555
"Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes"

Bullen R. A., Arnot T. C., Lakeman J. B., Walsh F.C.
Biosensors and Bioelectronics **21**, 2006, 2015-2045.
"Biofuel Cells and their development"

Burns J. L., Ginn B. R., Bates D. J., Dublin S. N., Taylor J. V., Apkarian R., Amaro-Garcia S., Neal A. L., DiChristina D. J.
Environmental Science and Technology **44**, 2010, 68-73
"Outer membrane associated serine protease involved in adhesion on *Shewanella oneidensis* to Fe(III) oxides"

Butler J. E., Kaufmann F., Coppi M. V., Núñez C., Lovley D. R.
Journal of Bacteriology **186**, 2004, 4042-4045
"MacA a diheme c- type cytochrome involved in Fe(III) reduction by *Geobacter sulfurreducens*"

Bulter C., Clauwaert P., Green S. J., Verstraete W., Neremberg R.
Environmental Science and Technology **44**, 2010, 4685-4691
"Bioelectrochemical perchlorate reduction in a microbial fuel cell"

C

Cao B., Shi L., Brown R. N., Xiong Y., Fredrickson J. K. Romine M. F., Marshall M. J., Lipton M. S., Beyenal H.
Environmental Microbiology **13**, 2011, 1018-1031
"Extrapolymeric substances from *Shewanella* sp. HRCR-1 biofilms: characterization by infrared spectroscopy and proteomics"

Castelle C., Guiral M., Malarte G., Ledgham F., Leroy G., Breugna M., Guidici-Ortoni M.

Journal of Biological Chemistry **283**, 2008, 2580325811

"A new iron-oxidizing / O₂ reducing supercomplex spanning both inner and outer membranes, isolated from the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*"

Carbajosa S., Malki M., Caillard R., Lopez M. F., Palomares F. J., Martin-Gago J. A., Rodriguez N., Amils R., Fernandez V. M., De Lacey A. L.

Biosensors and Bioelectronics **26**, 2010, 877-880

"Electrochemical growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on a graphite electrode for obtaining a biocathode for direct electrocatalytic reduction of oxygen"

Clarke T. A., Edwards M. J., Gates A. J., Hall A., White G. F., Bradley J., Reardon C. L., Shi L., Beliaev A. S., Marshall M. J., Wang Z., Wartmough N. J., Fredrickson J. K., Zachara J. M., Butt J. N., Richardson D. J.

PNAS **108**, 2001, 9384-9389

"Structure of a bacterial cell surface decaheme electron conduit"

Clauwaert P., Rabaey K., Aelterman P., De Schamphelaire L., Pham T. H., Boeckx P., Boon N., Verstraete W.

Environmental Science and Technology **41**, 2007, 3354-3360

"Biological denitrification in Microbial Fuel Cells"

Clauwaert P., Aelterman P., Pham T. H., De Schamphelaire L., Carballa M., Rabaey K., Verstraete W.

Applied Microbial Biotechnology **79**, 2008, 901-913

"Minimizing losses in bio-electrochemical systems: the road to applications"

Courjean O., Gao F., Mano N.

Angewandte Chemie, International edition **121**, 2009, 6011-6013

"Deglycosylation of glucose oxydase for direct and efficient glucose electrooxydation on a glassy carbon electrode"

Cournet A., Délia M. L., Bergel A., Roques C., Bergé M.

Electrochemical Communications **12**, 2010, 505-508

"Electrochemical reduction of oxygen catalyzed by a wide range of bacteria including Gram-positive"

Cheng S., Xind D., Call D. F., Logan B. E.

Environmental Science and Technology **43**, 2009, 3953-3958

"Direct biological conversion of electrical current into methane by electromethanogenesis"

Cheng K. Y., Ho G., Cord-Ruwisch R.

Environmental Science and Technology **44**, 2010, 518-525

"Anodic biofilm catalyzes cathodic oxygen reduction"

E

Erable B., Féron D., Bergel A.

ChemSusChem **5**, 2012, 975-987

"Microbial catalysis of the oxygen reduction reaction for microbial fuel cells: a review"

Erable B., Vandecandelaere I., Delia M.L., Etcheverry L., Vandamme P., Bergel A.
Bioelectrochemistry **78**, 2010, 51-56
"Marine aerobic biofilm as biocathode catalyst"

E

Firer-Sherwood M., Pulcu Goekce S., Elliott S. J.
Journal of Biological Inorganic Chemistry **13**, 2008, 849-854
"Electrochemical interrogations of the Mtr cytochromes from *Shewanella*: opening a potential window"

Fonseca B. M., Paquete C. M., Neto S. E., Pacheco I., Soares C. M., Louro R. O.
Biochemical Journal **449**, 2013, 101-108
"Mind the gap: cytochrome interactions reveal electron pathways across the periplasm of *Shewanella oneidensis* MR-1"

Freguia S., Masuda M., Tsujimura S., Kano K.
Bioelectrochemistry **76**, 2009, 14-18
"Lactococcus lactis catalyses electricity generation at microbial fuel cell anodes via excretion of soluble quinone"

Freguia S., Tsujimura S., Kano K.
Electrochimica Acta **55**, 2010, 813-818
"Electron pathways in microbial oxygen biocathodes"

G

Grätzel M.
Nature **414**, 2001, 338-344
"Photoelectrochemical cells"

Gregory K. B., Bond D. R., Lovley D. R.
Environmental Microbiology **6**, 2004, 596-604
"Graphite electrodes as electron donors for anaerobic respiration"

Gregory K. B. et Lovely D.R.
Environmental Science and Technology **39**, 2005, 8943-8947
"Remediation and recovery of uranium from contaminated subsurface environments with electrodes"

H

Hamelers H. V. M., Ter Heijne A., Sleutels T. H. J. A., Jeremiasse A. W., Strik D. P. B. T. B., Buisman C. J. N.
Applied Microbial Biotechnology **85**, 2010, 1673-1685
"New application and performance of bioelectrochemical systems"

Hartshorne R., Robert S., Jepson B. N., Clarke T. A., Field S. J., Fredrickson J., Zachara J., Shi L., Butt J. N., Richardson D. J.
Journal of Biological Inorganic Chemistry **12**, 2007, 1083-1094

“Characterization of *Shewanella oneidensis* MtrC: a cell-surface decaheme cytochrome involved in respiratory electron transport to extracellular electron acceptors”

Harnisch F., Schröder U.

Chemical Society Reviews **39**, 2010, 4433-4448

“From MFC to MXC: chemical and biological cathodes and their potential for microbial bioelectrochemical systems”

Heller A.

Accounts of Chemical Research **23**, 1990, 128-134

“Electrical wiring of redox enzyme”

Heller A.

Current Opinion in Chemical Biology **10**, 2006, 664-672

“Electron conducting redox hydrogels: design, characteristics and synthesis”

Holmes D. E., Chaudhuri S. K., Nevin K. P., Mheta T., Methé B. A., Liu A., Ward J. E., Woodard T. L., Webster J., Lovley D. R.

Environmental microbiology **8**, 2006, 1805-1815

“Microarray and genetic analysis of electron transfer to electrodes in *Geobacter sulfurreducens*”

Huang L., Regan J. M., Quan X.

Bioresource Technology **102**, 2011, 316-323

“Electron transfer mechanisms, new application and performance of biocathode microbial fuel cells”

I

Inoue K, Qian X., Morgado L., Kim B.C., Mester T., Izaallen M., Salguiero C. A., Lovley D. R.
Applied and Environmental Microbiology **76**, 2010, 3999-4007

“Purification and characterization of OmcZ, an outer surface octaheme c type cytochrome essential for optimal current production by *Geobacter sulfurreducens*”

Inoue K., Leang C., Franks A. E., Woodard T. L., Nevin K. P., Lovley D. R.

Environmental Microbiology Reports **3**, 2001, 211-217

“Specific localization of c-type cytochrome OmcZ at the anode surface in current-producing biofilms of *Geobacter sulfurreducens*”

K

Kim T. S., Kim B. H.

Biotechnology Letters **10**, 1988, 123-128

“Electron flow shift in *Clostridium acetobutylicum* fermentation by electrochemically introduced reducing equivalent”

Kim B. C., Lovley D. R.

FEMS Microbiology Letters **286**, 2008, 39-44

“Investigation of direct vs. indirect involvement of c-type cytochrome MacA in Fe(III) reduction of *Geobacter sulfurreducens*”

Kim J. R., Premier G. C., Hawkes F. R., Rodríguez J., Dinsdale R. M., Guwy A. J.
Bioresource Technology **101**, 2010, 1190-1198
“Modular tubular microbial fuel cells for energy recovery during sucrose wastewater treatment at low organic loading rate”

L

Lapinsonnière L., Picot M., Barrière F.
ChemSusChem **5**, 2012, 995-1005
“Enzymatic versus Microbial bio-catalyzed electrodes in bio-electrochemical systems”

Leang C., Coppi M. V., Lovley D. R.
Journal of Bacteriology **183**, 2003, 2096-2103
“OmcB, a c-type polyheme cytochrome, involved in Fe(III) reduction in *Geobacter sulfurreducens*”

Leang C., Qian X., Mester T., Lovley D. R.
Applied and Environmental Microbiology **76**, 2010, 4080-4084.
“Alignment of the c-Type cytochromes OmcS along Pili of *Geobacter sulfurreducens*”

Lefebvre O., Al-Mamun A., Ng H. Y.
Water Science and Technology **58**, 2008, 881-885
“A microbial fuel cell equipped with biocathode for organic removal and denitrification”

Liu H., Matsuda S., Hashimoto K., Nakanishi S.
ChemSusChem **5**, 2012, 1054-1058
“Flavins secreted by bacterial cells of *Shewanella* catalyze cathodic oxygen reduction”

Logan B. E., Rabaey K.
Science **337**, 2012, 686-690
“Conversion of wastes into bioelectricity and chemicals by using microbial electrochemical technologies”

Logan B. E., Call D., Cheng S., Hamelers H. V. M., Sleutels T. H. J. A. Jeremiasse A. W., Rozendal R. A.
Environmental Science and Technology **42**, 2008, 8630-8640
“Microbial electrolysis cells for high yield hydrogen gas production from organic matter”

Lovley D. R., Holmes D. E.
Advanced Microbial Physiology **49**, 2004, 219-286
“Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction”

Lovley D. R.
Environmental Microbiology Reports **3**, 2011, 27-35
“Powering microbes with electricity: direct electron transfer from electrodes to microbes”

Llyod J. R., Leang C., Hodges Myerson A. L., Coppi M. V., Cuifo S., Methé B., Sandler S. J., Lovley D. R.

Biochemical Journal **369**, 2003, 153-161

“Biochemical and genetic characterization of PpcA, a periplasmic c-type cytochrome in *Geobacter sulfurreducens*”

M

Malvankhar N. S., Lau J., Nevin K. P., Franks A. E., Tuominen M. T., Lovley D. R.

Applied and Environmental Microbiology **78**, 2012, 5967-5971

“Electrical Conductivity in a mixed-species biofilm”

Malvankhar N. S., Tuominen M. T., Lovley D. R.

Energy and Environmental Science **5**, 2012, 8651-8659

“Lack of cytochrome involvement in long-range electron transport through conductive biofilms and nanowire of *Geobacter sulfurreducens*”

Malvankhar N. S., Tuominen M. T., Lovley D. R.

Energy and Environmental Science **5**, 2012, 6247-6249

“Comment on “On the electrical conductivity of microbial nanowires and biofilms”
Strycharz-Glaven S. M., Snider R. M., Guiseppi-Elie A., Tender L. M., *Energy and Environmental Science* **4**, 2011, 4366-4379”

Marsili E., Baron D. B., Shikhare I. D., Coursolle D., Grlanick J. A., Bond D. R.

PNAS **105**, 2008, 3968-3973

“*Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer”

McMillan D. G. G., Marritt S. J., Butt J. N., Jeuken L. J. C.

Journal of Biological Chemistry **287**, 2012, 14215-14225

“Menaquinone-7 is specific cofactor in tetraheme quinol dehydrogenase CymA”

Mehta T., Coppi M. V., Childers S. E., Lovley D. R.

Applied and Environmental Microbiology **71**, 2005, 8634-8641

“Outer membrane c-type cytochrome required for Fe(III) and Mn(IV) oxide reduction in *Geobacter sulfurreducens*”

Methé B. A., Nelson K. E., Eisen J. A. Paulsen I. T., Nelson W., Heidelberg J. F., Wu D., Wu M., Ward N., Beanan M. J., Dodson R. J., Madupu R., Brinkac L. M., Daugherty S. C., DeBoy R. T., Durkin A. S., Gwinn M., Kolonay J. F., Sullivan S. A., Haft D. H., Selengut J., Davidsen T. M., Zafar N., White O., Tran B., Romero C., Forberger H. A., Weidman J., Khouri H., Feldblyum T. V., Utterback T. R., Van Aken, S. E., Lovley D. R., Fraser C. M.

Science **302**, 2003, 1967-1969

“Genome of *Geobacter sulfurreducens*: Metal Reduction in Subsurface Environments “

N

Nevin K. P., Lovley D. R.

Applied Environmental Microbiology **66**, 2000, 2248-2251

“Lack of production of electron-shuttling compounds or solubilization of Fe(III) during reduction of insoluble Fe(II) oxide by *Geobacter metallireducens*”

Nevin K. P., Kim B. C., Glaven R. H., Jonhson J. P., Woodard T. L., Methé B. A., DiDonato R. J., Covalla S. F., Franks A. E., Liu A. L., Lovley D. R.

PLoS ONE **4**, 2009

“Anode biofilms transcriptomics reveals outer surface components essential for high density current production in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells”

Nevin K. P., Woodard T. L., Franks A. E., Summers Z. M. Lovley D. R.

mBio **1**, 2010, 1-4

“Microbial Electrosynthesis: feeding microbes electricity to convert carbon dioxide and water to multicarbon extracellular organic compounds”

Nevin K. P., Hensley S. A., Franks A. E., Summers Z. M., Ou J., Woodard T. L., Snoeyenbos-West O. L., Lovley D. R.

Applied and Environmental Microbiology **77**, 2011, 2882-2886

“Electrosynthesis of organic compounds from carbon dioxide is catalyzed by a diversity of acetogenic microorganisms”

Nguyen T. A., Lu Y., Yang X., Shi X.

Environmental Science Technology **41**, 2007, 7987-7996

“Carbon and steel surfaces modified by *Lepthothrix discophora* SP-6: characterization and implications”

P

Pant D., Singh A., Van Bogaert G., Olsen S. I., Nigam P. S., Diels L., Vanbroekhoven K.

RSC Advances **2**, 2012, 1248-1263

“Bioelectrochemical systems (BES) for sustainable energy production and product recovery from organic wastes and industrial wastewaters”

Parot S., Vandecandelaere I., Cournet A., Délia M. L., Vandamme P., Bergé M., Roquez C., Bergel A.

Bioresource Technology **102**, 2011, 304-311

“Catalysis of the electrochemical reduction of oxygen by bacteria isolated from electro-active biofilms formed in seawater”

Picot M., Rodulfo R., Nicolas I., Barrière F., Szymczyk A.

Journal of Membrane Science **417**, 2012, 131-136

“A versatile route to modify polyethersulfone membrane by chemical reduction of aryldiazonium salts”

Potter M. C.

Proceeding of the Royal Society **84**, 1911, 260-276

“Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds”

Puig S., Serra M., Vilar-Sanz A., Cabré M., Bañez L., Colprim J., Balguer M. D.

Bioresource Technology **102**, 2011, 4462-4467

“Autotrophic nitrite removal in the cathode of microbial fuel cells”

Q

Qian X., Reguera G., Mester T., Lovley D. R.
FEMS Microbiology Letters **277**, 2007, 21-27
“Evidence that OmcB and OmpB of *Geobacter sulfurreducens* are outermembrane surface proteins”

R

Rabaey K., Read S. T., Clauwaert P., Freguia S., Bond P. L., Blackall L. L., Keller J.
ISME Journal **2**, 2008, 519-527
“Cathodic oxygen reduction catalyzed by bacteria in microbial fuel cells”

Rabaey K., Bützer S., Brown S., Keller J., Rozendal R. A.
Environmental Science and Technology **44**, 2010, 4315-4321
“High current generation coupled to caustic production using a lamellar bioelectrochemical systems”

Rabaey K., Rozendal R. A.
Nature **8**, 2010, 706-716
“Microbial electrosynthesis – revisiting the electrical route for microbial production”

Rabaey K., Girguis P., Nielsen L. K.
Current opinion in Biotechnology **22**, 2011, 371-377
“Metabolic and practical considerations on microbial elctrosynthesis”

Reguera G., MacCarthy K. D., Mehta T., Nicoll J. S., Tuominen M. T., Lovley D. R.
Nature Letters **453**, 2005, 1098-1101
“Extracellular electron transfer via microbial nanowires”

Reguera G., Nevin K. P., Nicoll J. S., Coavalla S. F., Woodard T. L., Lovley D. R.
Applied and Environmental Microbiology **72**, 2006, 7345-7348
“Biofilm and nanowire production leads to current in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells”

Richardson D. J., Butt J. N., Fredickson J. K., Shi L., Edwards M. J., White G., Baiden N., Gates A. J., Marritt S. J., Clarke T. A.
Molecular Microbiology **85**, 2012, 201-212
“The ‘porin-cytochrome’ model for microbe-to-mineral electron transfer”

Richter H., Nevin K. P., Jia H., Lowy D. A., Lovley D. R., Tender L. M.
Energy and Environmental Science **2**, 2009, 506-516
“Cyclic voltammetry of biofilm of wild type and mutant *Geobacter sulfurreducens* in fuel cells anodes indicates possible roles of OmcB, OmcZ, tyope IV pili and protons in extracellular transfer”

Rhoads A., Beyenal H., Lewandowski Z.
Environmental Science and Technology **39**, 2005, 4666-4671
“Microbial fuel cell using anaerobic respiration as an anodic reaction and biomineralized manganese as a cathodic reactants”

Rosenbaum M., Aulenta F., Villano M., Angenent L. T.
Bioresource Technology **102**, 2011, 324-333
"Cathodes as electrons donors for microbial metabolism: Which extracellular electron transfer mechanisms are involved?"

Rozendal R. A., Jeremiasse A. W., Hamelers H. V. M., Buisman C. J. N.
Environmental Science and Technology **42**, 2008, 629-634
"Hydrogen production with a microbial biocathode"

Rozendal R. A., Hamelers H. V. M., Rabeu K., Keller J., Buisman C. J. N.
Trends in Biotechnology **26**, 2008, 450-458
"Towards practical implementation of bioelectrochemical wastewater treatment"

Rozendal R. A., Leone E., Keller J., Rabaey K.
Electrochemistry Communications **11**, 2009, 1752-1755
"Efficient hydrogen peroxide generation from organic matter in a bioelectrochemical system"

S

Schröder U.
Physical Chemistry Chemical Physics **9**, 2007, 2619-2629
"Anodic electron transfer mechanisms in microbial fuel cells and their energy efficiency"

Seidel J., Hoffmann M., Ells K. E., Seidel A., Spatzal T., Gerhardt S., Elliot S. J., Einsle O.
Biochemistry **51**, 2012, 2747-2756
"MacA is a second cytochrome c peroxidase of *Geobacter sulfurreducens*"

Shi L., Squier T. C., Zachara J. M., Fredrickson J. K.
Molecular Microbiology **65**, 2007, 12-20
"Respiration of metal (hydr)oxides by *Shewanella* and *Geobacter*: a key role for multihaem c-type cytochromes"

Shi L., Richardson D. J., Wang Z., Kerisit S. N., Rosso K. M., Zachara J. M., Fredrickson J. K.
Environmental Microbiology Reports **1**, 2009, 220-227
"The roles of outer membrane cytochromes of *Shewanella* and *Geobacter* in extracellular transfer"

Smith D. M. A., Rosso K. M., Dupuis M., Valiev M., Straatsma T. P.
Journal of Physical Chemistry **110**, 2006, 15582-15588
"Electronic Coupling between Heme Electron-Transfer Centers and Its Decay with Distance Depends Strongly on Relative Orientation"

Sokic-Lazic D., Arecherrra R. L., Treu B. L., Minteer S. D.
Electroanalysis **22**, 2010, 757-764
"Oxidation of biofuels: fuel diversity and effectiveness of fuel oxidation through multiple enzyme cascade"

Strycharz-Glaven S. M., Snider R. M., Guiseppi-Elie A., Tender L. M.
Energy and Environmental Science **4**, 2011, 4366-4379
"On the electrical conductivity of microbial nanowires and biofilms"

Strycharz-Glaven S. M., Tender L. M.
Energy and Environmental Science **5**, 2012, 6250-6255.
"Reply to the 'Comment on "On electrical conductivity of microbial nanowires and biofilms"' by N. S. Malvankar, M. T. Tuominen and D. R. Lovley, *Energy and Environmental Science*, 2012, 5, 6247-6249"

Strycharz S. M., Glaven R. H., Coppi M. V., Gannon S. M., Perpetua L. A., Liu A., Nevin K. P., Lovley D. R.
Bioelectrochemistry **80**, 2011, 142-150
"Gene expression deletion analysis of mechanisms for electron transfer from electrodes to *Geobacter sulfurreducens*"

Szymczyk A., Dirir Y. I., Picot M., Nicolas I., Barrière F.
Journal of Membrane Science **429**, 2013, 44-51
"Advanced electrokinetic characterization of composite porous membranes"

I

Tender L. M., Gray S. A., Groveman E., Lowy D. A., Kauffman P., Melhado J., Tyce R. C., Flynn D., Petrecca R., Dobarro D.
Journal of Power Sources **179**, 2008, 571-575
"The first demonstration of a microbial fuel cell as a viable power supply: Powering a meteorological buoy"

Thomas Y. R. J., Picot M., Carer A., Berder O., Sentieys O., Barrière F.
Journal of Power Sources **241**, 2013, 703-708
"A single sediment-microbial fuel cell powering a wireless telecommunication system"

Trash J. C., Van Trump I. V., Weber K. A., Miller E., Achenbach L. A., Coates J. D.
Environmental Science and Technology **41**, 2007, 1740-1476
"Electrochemical stimulation of microbial perchlorate reduction"

V

Virdis B., Rabaey K., Yuan Z., Keller J.
Water Research **42**, 2008, 3013-3024
"Microbial fuel cells for simultaneous carbon and nitrogen removal"

Virdis B., Rabaey K., Rozendal R. A., Yuan Z., Keller J.
Water Research **44**, 2010, 2970-2980
"Simultaneous nitrification, denitrification and carbon removal in microbial fuel cells"

Von Canstein H., Ogawa J., Shimizu S., Llyod J. R.
Applied Environmental Microbiology **74**, 2008, 615-623
"Secretions of flavins by *Shewanella* species and their role in extracellular electron transfer"

Villano M., Aulenta F., Ciucci C., Ferri T., Giuliano A., Majone M.

Bioresource Technology **101**, 2010, 3085-3090

"Bioelectrochemical reduction of CO₂ to CH₄ via direct and indirect extracellular electron transfer by a hydrogenophilic methanogenic culture"

W

Weber K. A., Achenbach L. A., Coates J. D.

Nature Reviews **4**, 2006, 752-764

"Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction"

White G. F., Shi Z., Shi L., Wang Z., Dohnalkova A. C., Marshall M. J., Fredrickson J. K., Zachara J. M., Butt J. N., Richardson D. J., Clarke T. A.

PNAS **110**, 2013, 6346-6351

"Rapid electron exchange between surface-exposed bacterial cytochromes and Fe(III) minerals"

Wrighton K. C., Thrash J. C., Melnyk R. A., Bigi J. P.

Applied and Environmental Microbiology **77**, 2011, 7633-7639

"Evidence for direct electron transfer by a gram positive bacterium isolated from a microbial fuel cell"

X

Xia X., Sun Y., Liang P., Huang X.

Bioresource Technology **120**, 2012, 26-33

"Long term effect of set potential on biocathodes in microbial fuel cells: electrochemical and phylogenetic characterization"

Y

Yates M. D., Kiely P. D., Call D. F., Rismani-Yasdi H., Bibby K., Peccia J., Regan J. M., Logan B. E.

The ISME Journal **6**, 2012, 2002-20013

"Convergent development of anodic bacterial communities in microbial fuel cells"

Z

Zhu X. G., Long S. P., Ort D. R.

Current Opinion in Biotechnology **19**, 2008, 153-159

"What is the maximum efficiency with which photosynthesis can convert solar energy to biomass?"

Chapitre 2

Etude de l'adaptation des bioanodes à des changements de substrats anodiques

Sommaire

Introduction	80
1 Fonctionnement d'une anode microbiologique en vue d'une application à l'épuration d'eaux usées.....	82
1.1 Nécessité d'une syntrophie entre bactéries électroactives et bactéries fermentaires pour l'oxydation anodique de composés organiques complexes	82
1.1.1 <i>Rappels sur le métabolisme des bactéries électroactives.....</i>	<i>82</i>
1.1.2 <i>La syntrophie entre bactéries fermentaires et bactéries électroactives.....</i>	<i>84</i>
1.2 Démarches entreprises dans cette étude	86
1.2.1 <i>Adaptation à un substrat nouveau.....</i>	<i>87</i>
1.2.2 <i>Oxydation de substrats à l'anode : influence de la prédominance de bactéries électroactives à l'anode.....</i>	<i>87</i>
1.2.3 <i>Influence du renouvellement de l'anolyte sur les performances des bioanodes, pour deux substrats différents (l'acétate et le glucose)</i>	<i>88</i>
2 Etude de l'adaptation de biofilms anodiques de maturité différente face à des changements de substrats	89
2.1 Temps de latence des bioanodes jeunes et matures face à un changement de substrat	90
2.2 Performances de bioanodes jeunes et matures pour l'oxydation de différents substrats fournis	93
2.2.1 <i>Rapidité des biofilms à dégrader le substrat, après acclimatation</i>	<i>94</i>
2.2.2 <i>Efficacités faradiques.....</i>	<i>96</i>
2.2.3 <i>Puissances maximales des piles et leurs limitations.....</i>	<i>99</i>
2.2.4 <i>Courants catalytiques maximaux délivrés par les bioanodes.....</i>	<i>104</i>
2.2.5 <i>Electroactivité des molécules redox connectant le biofilm à l'anode suivant le substrat fourni</i>	<i>107</i>
2.3 Bilan.....	110

3 Etude de l'adaptation de biofilms anodiques face à des changements de substrats avec ou sans renouvellement de l'anolyte.....	111
3.1 Temps de latence consécutif à un changement de substrat	112
3.2 Rapidité des biofilms à dégrader le substrat (acétate et glucose) après acclimatation au substrat	113
3.3 Efficacité faradique des biofilms anodiques sous acétate et sous glucose	115
3.4 Performances électriques et limitations des biofilms anodiques catalysant l'oxydation de l'acétate ou du glucose	116
3.5 Courants catalytiques de l'oxydation de l'acétate ou du glucose par les biofilms anodiques.....	118
3.6 Bilan	119
Conclusion du Chapitre 2	120
Section expérimentale	123
Description des piles à combustible microbienne utilisées	123
Construction du dispositif.....	124
Mesure d'efficacité faradique	125
Mesure de Carbone organique Total (COT).....	126
Mesure de polarisation.....	126
Etude de l'électroactivité de biofilms.....	127
Références du Chapitre 2	128

Introduction

La Pile à Combustible Microbiologique (PCM) a été le premier système microbioélectrochimique étudié. Dans ce système, des composés organiques servent de donneurs d'électrons et leur oxydation est catalysée par un biofilm bactérien présent à la surface de l'anode. Les électrons générés par ces réactions circulent dans un circuit électrique externe jusqu'à la cathode, où ils sont impliqués dans une réaction de réduction abiotique ou biologique. Ce système permet donc, à l'instar d'une pile à combustible classique, la conversion de l'énergie chimique contenue dans les donneurs et accepteurs d'électrons fournis au système en courant électrique.

A l'anode des PCMs, le donneur d'électrons est un composé organique servant de substrat aux bactéries électroactives. Afin de produire l'énergie nécessaire au développement du microorganisme, ce substrat est oxydé en CO_2 et les électrons générés sont transférés à l'électrode qui sert d'accepteur final d'électrons pour le métabolisme respiratoire des bactéries électroactives. Cette oxydation anodique permet d'envisager un deuxième intérêt des PCMs en plus de la production d'électricité. En effet, utiliser des déchets organiques présents dans les eaux usées comme substrat anodique permet en principe de coupler la production d'électricité à l'épuration d'eaux usées.

L'utilisation de mélanges de polluants comme substrat anodique pose cependant la question de l'adaptation du biofilm microbien à différents composés organiques. En effet, les eaux usées sont constituées d'un mélange de composés très divers, dont la composition peut fluctuer au cours du temps, notamment dans le cas d'eaux résiduaire urbaines. Or, Le substrat, est d'une importance capitale dans n'importe quel procédé biologique puisqu'il sert à la fois de nutriment et de source d'énergie. Seules, les bactéries électroactives ne sont capables d'oxyder qu'un nombre limité de substrats, notamment des acides organiques tels que l'acétate. Pour dégrader des substrats plus complexes à l'anode de piles à combustible microbiologiques, il est nécessaire que différentes espèces microbiennes collaborent, dans ce qu'on appelle des réseaux trophiques. Les études montrent que les performances des piles sont moins importantes sur des eaux usées réelles que sur des milieux synthétiques contenant des substrats non fermentescibles, directement dégradables par les bactéries électroactives. Outre le fait que les eaux usées réelles possèdent une conductivité ionique et un pouvoir tampon faibles, il est possible que la dégradation des composants complexes constituant les eaux usées soit un

procédé lent ou que des espèces indésirables se développent et entrent en compétition avec les espèces générant de l'électricité. Or l'activité biologique des bactéries électroactives ainsi que leur cinétique métabolique influencent fortement les puissances délivrées par les piles. Ainsi, l'étude de la réponse des PCMs face au changement de substrat contribue à la compréhension, la prévision, l'optimisation, voire le contrôle de la production d'électricité à partir d'un flux complexe et dynamique de matière organique. Cette question de l'adaptation des biofilms à différents substrats fait l'objet de cette première étude du travail de thèse.

Dans une **première partie** de ce Chapitre 2, l'état de l'art des connaissances sur la capacité des bioanodes à oxyder différents substrats organiques grâce à des associations bactériennes est présenté.

Dans la **seconde partie** de ce chapitre, nous discuterons d'une étude menée au cours de ce travail de thèse sur l'adaptation des bioanodes à des substrats organiques fermentescibles en fonction de l'enrichissement des bioanodes en espèces bactériennes électroactives.

La **troisième partie** de ce chapitre est consacrée à l'étude de l'adaptation des bioanodes à des substrats organiques fermentescibles avec ou sans renouvellement régulier de l'anolyte.

1 Fonctionnement d'une anode microbiologique en vue d'une application à l'épuration d'eaux usées

Les bactéries disposent de formidables machineries cellulaires qui leur permettent de s'adapter et survivre dans des environnements très divers. Ainsi, en choisissant les souches bactériennes, les associations d'espèces et les conditions de culture adaptées, l'Homme est capable d'exploiter ces véritables mini réacteurs biochimiques dans des industries biotechnologiques (Bullen et al. 2006).

1.1 Nécessité d'une syntrophie entre bactéries électroactives et bactéries fermentaires pour l'oxydation anodique de composés organiques complexes

1.1.1 Rappels sur le métabolisme des bactéries électroactives

Chez l'ensemble des êtres vivants, et notamment chez les bactéries, les transferts électroniques sont des réactions primordiales du métabolisme énergétique. Pour les bactéries électroactives anodiques, ces réactions de transfert électronique font intervenir des donneurs d'électrons qui sont des acides gras volatils, typiquement l'acétate, et un accepteur d'électron solide qu'est l'anode. De ces transferts électroniques entre l'acétate et l'anode, les bactéries génèrent de l'énergie facilement disponible pour la croissance (ATP et pouvoir réducteur). La particularité des bactéries électroactives est qu'elles sont capables d'utiliser des oxydes métalliques à l'état solide comme accepteurs d'électrons dans leur métabolisme énergétique. Ce métabolisme est une forme de respiration originale qui permet d'expliquer leur association avec des électrodes dans des systèmes électrochimiques et qui en font des catalyseurs des réactions d'oxydation. L'étape de transfert électronique hétérogène de la bactérie vers l'électrode fait intervenir plusieurs mécanismes (voir aussi **Figure 1** ci-dessous) :

- 1) Le transfert électronique direct, par l'intermédiaire de cytochromes de type c membranaires
- 2) le transfert électronique direct à l'aide d'appendices microbiens conducteurs, les pilis
- 3) le transfert électronique indirect à l'aide de médiateurs artificiels ou sécrétés.

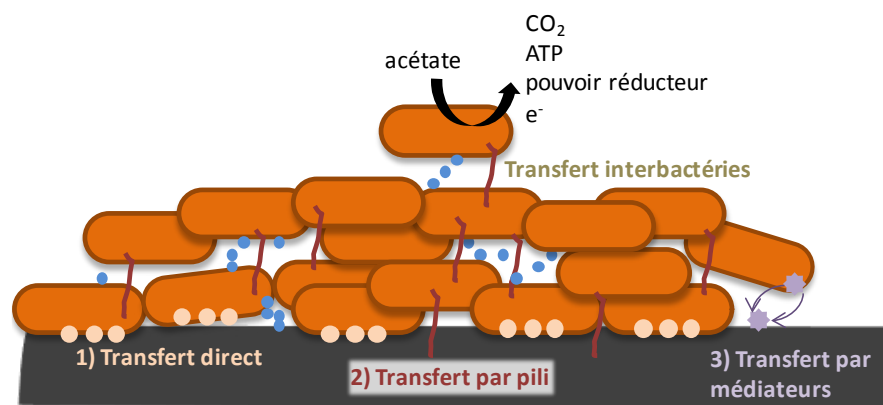


Figure 1 Représentation schématique de l'oxydation anodique par les bactéries électroactives et des différents mécanismes de transfert électronique vers l'anode

Les bactéries électroactives forment à la surface des anodes des biofilms épais constitués de plusieurs couches de bactéries. Les bactéries en contact direct avec l'électrode, transfèrent majoritairement les électrons via des cytochromes membranaires. Les bactéries plus éloignées, transmettent leurs électrons à l'électrode grâce aux pilis ou aux médiateurs. Il existe aussi un réseau de transfert électronique dans la matrice du biofilm, permettant de connecter les bactéries entre elles et à l'électrode. Ce réseau est constitué de pilis et de cytochromes extramembranaires.

À l'anode des piles à combustible microbiennes, les bactéries électroactives les plus connues et fréquentes font partie des espèces telles que *Geobacter sulfurreducens* ou *Shewanella oneidensis* (Debabov 2008) capables de réduire des oxydes métalliques. Dans beaucoup d'études de biofilm anodique, la source de bactéries à partir de laquelle les biofilms se développent est un mélange non caractérisé de différentes espèces bactériennes contenues typiquement dans de la terre, des boues de stations d'épuration ou du terreau. Les conditions de culture de ce mélange bactérien à l'anode est favorable au développement d'un biofilm catalytique performant qui devient majoritairement composé de bactéries électroactives de la famille *Geobacter* (Yates et al. 2012). D'autres études sont réalisées à partir de souches pures de bactéries sauvages telles que *Geobacter sulfurreducens* KN-400 ou de *Shewanella oneidensis* MR-1. Ces bactéries électroactives sont efficaces dans la génération d'électricité car elles possèdent un métabolisme adapté aux transferts électroniques extracellulaires. Toutefois, pour la plupart des bactéries électroactives ce métabolisme ne permet la génération de courant qu'à partir d'un nombre assez limité de donneurs d'électrons puisqu'il s'agit d'acides gras volatils (acétate, lactate, formate).

1.1.2 La syntrophie entre bactéries fermentaires et bactéries électroactives

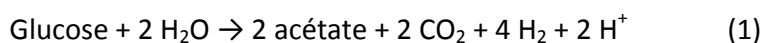
Lorsque le substrat fourni à l'anode est plus complexe, pour une application dans le traitement des eaux usées par exemple, sa dégradation se fait en plusieurs étapes successives à l'aide de différentes communautés bactériennes établies sur le biofilm ou/et dans l'anolyte (Logan et Regan 2006, Parameswaran et al. 2010, Freguia et al. 2008, Renz et al. 2007).

Diversité des espèces bactériennes en fonction du substrat

De nombreux travaux ont permis d'étudier comment les substrats fournis influencent la composition des communautés microbiennes d'anodes développées à partir de cultures bactériennes mixtes. Ces travaux montrent que suivant les substrats fournis, les communautés bactériennes peuvent être extrêmement diverses. Ainsi, lorsque le substrat fourni est un acide gras volatil, les biofilms sont souvent enrichis en bactéries connues pour réduire les oxydes de fer, et particulièrement des bactéries électroactives de la famille des *Geobacteraceae* (Kiely et al. 2011, Pant et al. 2010). Une étude récente (Yates et al. 2012) a même montré que des biofilms anodiques développés à partir de différentes sources mixtes de bactéries s'enrichissaient progressivement en bactéries de la famille *Geobacter* lorsque l'acétate est utilisé comme substrat. Cette observation, réalisée pour un type précis de Pile à Combustible Microbiologique, suggère que l'acétate est le donneur d'électrons privilégié par les bactéries de la famille *Geobacter* (Yang et al. 2010). Les conditions environnementales dans l'anolyte constituent une pression de sélection favorable aux bactéries électroactives de type *Geobacter*. En revanche, la prédominance de *Geobacter* n'existe pas forcément lorsque d'autres acides gras volatils sont utilisés (Speers et Reguera et al. 2006) ou lorsque les substrats fournis sont plus complexes. Par exemple, lorsque les substrats fournis sont fermentescibles, on constate que les espèces présentes dans le biofilm se diversifient (Logan et Regan 2006). On observe notamment, en plus des espèces connues pour être électroactives (delta proteobacteria), une grande proportion de bactéries de type Firmicutes (Jung et al. 2007, Aelterman et al. 2006, Jong et al. 2006, Rabaey et al. 2004), qui seraient à l'origine de conversion des substrats complexes en acides gras volatils, servant aux bactéries électroactives. Par ailleurs, il a été démontré que la composition de ces communautés varie selon l'architecture de la pile et son mode de fonctionnement (Speers et Reguera 2012, Logan et Regan 2006). Ces espèces microbiennes non électroactives se développent dans l'anolyte et sur le biofilm, créant ainsi une division du biofilm avec d'une part des espèces électroactives proches de la surface de l'électrode et d'autre part, des espèces plus diversifiées du côté de l'anolyte (Malvankhar et al. 2012).

Relations syntrophiques avec les bactéries électroactives de l'anode

Afin de comprendre les liens entre les diverses communautés bactériennes à l'anode de piles à combustible microbiologiques, l'oxydation du glucose, un substrat fermentescible, est souvent pris pour modèle (Freguia et al. 2008, Zhang et al. 2011, Velasquez-Orta et al. 2011, Jung et Regan 2007). Bien qu'il existe une espèce bactérienne électroactive connue pour oxyder directement le glucose (*Rhodoferrax ferrireducens*, Chaudhuri et Lovley 2003), plusieurs travaux (Rabaey et al. 2003, Freguia et al. 2008) démontrent que l'oxydation du glucose sur une bioanode impliquerait une dégradation en plusieurs étapes. Selon l'analyse de Freguia et al. (2008), dans un premier temps, des bactéries fermentaires utilisent le glucose dans des réactions d'homoacétogénèse (1) et de fermentation mixte (2) et produisent ainsi de l'acétate, du propionate, du dihydrogène et du CO₂, comme explicité ci-dessous :



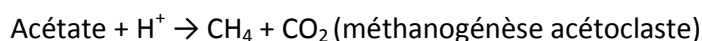
Les auteurs montrent alors que le dihydrogène et l'acétate/propionate sont métabolisés par le biofilm électroactif et participent à la génération d'électricité. La relation entre les deux communautés bactériennes est dite syntrophique car les deux espèces bénéficient de l'association. D'une part, les bactéries électroactives utilisent les produits du métabolisme des bactéries fermentaires. D'autre part, les bactéries fermentaires sont capables de se développer plus rapidement car les produits de la fermentation, qui lorsqu'ils s'accumulent inhibent le métabolisme, sont consommés par les bactéries du biofilm.

Relations de compétition pour le substrat à l'anode

Si la réaction de fermentation permet indirectement aux bactéries électroactives de générer du courant, elle peut aussi favoriser le développement d'un troisième type de microorganismes que sont les microorganismes méthanogènes. Il s'agit d'espèces indésirables à l'anode des piles à combustible microbiologiques car elles consomment les substrats fournis sans générer de l'électricité, causant ainsi des diminutions d'efficacité du système. Dans les réacteurs étudiés par Freguia et al. (2008), les méthanogènes seraient de type hydrogénotrophe. Les méthanogènes consomment une partie du dihydrogène produit par les réactions de fermentation au détriment du biofilm électroactif selon la réaction suivante :



D'autres auteurs (Velasquez-Orta et al. 2011) utilisant une configuration de pile différente montrent que deux tiers de l'acétate produit par la fermentation du glucose est consommé par des microorganismes méthanogènes dites acétoclastes, selon la réaction suivante :



La **Figure 2** ci-dessous résume ces interactions entre bactéries de métabolismes différents dans le cas de l'oxydation du glucose à l'anode :

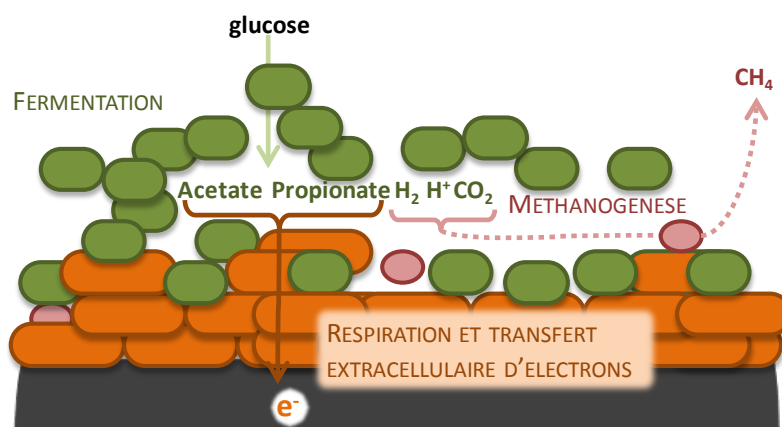


Figure 2 Schéma des interactions entre différentes communautés bactériennes pour la génération d'électricité à partir d'un substrat fermentescible comme le glucose

De nombreux substrats seuls ou en mélange, nécessitant plus ou moins d'étapes de dégradation avant récupération d'un courant électrique (Pant et al. 2010) ont été testés à l'anode de piles microbiennes. Les performances des piles varient selon le substrat utilisé. En effet, le substrat fourni à l'anode d'une PCM peut avoir un impact sur la structure et la composition de la communauté microbienne, ce qui affecterait à son tour l'efficacité du système. Les performances des systèmes microbioélectrochimiques dépendent en grande partie du métabolisme bactérien et de l'efficacité du transfert des électrons. Comprendre les mécanismes de dégradation des substrats permettra de prédire et d'optimiser la production d'électricité à partir d'un mélange de composés organiques que sont par exemple les eaux usées.

1.2 Démarches entreprises dans cette étude

L'étude de la dégradation du glucose a permis d'établir un modèle général pouvant s'appliquer à d'autres substrats fermentescibles. De nombreuses questions restent cependant en suspens.

1.2.1 Adaptation à un substrat nouveau

Beaucoup d'études, par exemple, ont été réalisées sur des biofilms soumis à des substrats différents mais très peu d'études s'intéressent aux effets liés au changement d'un substrat à un autre et à l'adaptabilité de biofilms établis face à des changements de substrats. Or, il s'agit d'un paramètre important à prendre en compte si on envisage une application des bioanodes dans l'épuration, en particulier pour des eaux usées urbaines dont la composition est susceptible de changer au cours du temps.

Notre démarche a été d'étudier l'adaptabilité des biofilms anodiques face au changement de substrat. Ainsi, nous avons testé le passage d'un substrat non fermentescible, l'acétate, à des substrats fermentescibles de complexités différentes que sont le glucose, un monosaccharide et le lactose, un disaccharide dont les structures sont présentées ci-dessous, **Figure 3**.

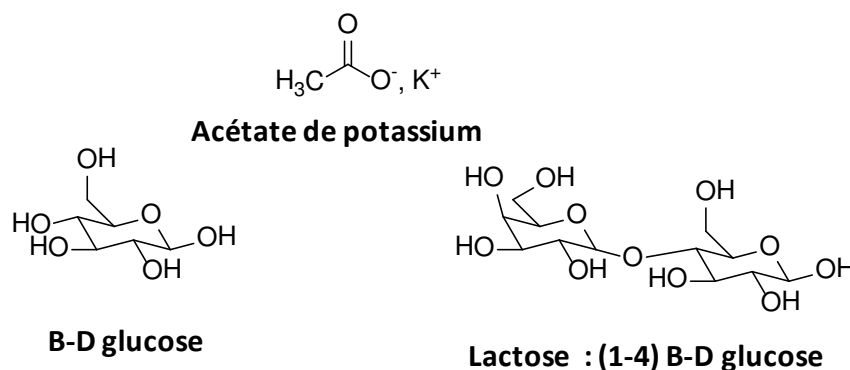


Figure 3 Structure des substrats utilisés pendant l'étude de l'adaptation des bioanodes à différents substrats

1.2.2 Oxydation de substrats à l'anode : influence de la prédominance de bactéries électroactives à l'anode

Il est possible d'enrichir le biofilm anodique en bactéries électroactives par pression de sélection sur les bactéries. En sélectionnant l'acétate comme donneur d'électrons et une anode connectée comme accepteur d'électrons, il est facile d'enrichir petit à petit le biofilm en bactéries électroactives de type *Geobacter* très performantes pour la génération d'électricité, (Liu et al. 2008), jusqu'à obtenir un biofilm constitué à plus de 95 % d'espèce de la famille *Geobacter* (Yates et al. 2012). Cette prédominance de *Geobacter* peut se vérifier aisément à l'anode car les bactéries électroactives ont une couleur distincte rose orangée, qu'on retrouve dans l'anolyte mais aussi sur l'anode (Malvankhar et al. 2012) lorsque les bactéries de type *Geobacter* sont présentes en grande quantité.

L'abondance de microorganismes électroactifs est susceptible d'influencer l'adaptation des bioanodes à différents substrats. En effet, certains auteurs suggèrent qu'une prédominance de bactéries électroactives à l'anode permet d'éviter le développement d'espèces indésirables comme les méthanogènes (Lee et al. 2008, Borole et al. 2011). En revanche, on peut penser qu'en diminuant la diversité des espèces bactériennes à l'anode, on diminue l'adaptabilité des biofilms à oxyder des substrats complexes et nouveaux.

Afin de comprendre l'influence de la prédominance des espèces électroactives dans les biofilms anodiques, les changements de substrats ont été testés sur deux types de biofilms électroactifs. Des biofilms jeunes et donc comportant des espèces bactériennes diverses et des biofilms électroactifs matures dans lesquels les bactéries de type *Geobacter* prédominent. L'adaptabilité des bioanodes a été mesurée à la fois par le temps de réponse mis par les biofilms avant la production du courant, le courant catalytique maximal et les puissances maximales délivrés par les biofilms. L'électroactivité des molécules redox en contact avec l'anode a été étudiée par voltamétrie cyclique suivant les différents substrats métabolisés. Cette étude est discutée en partie 2 de ce chapitre.

1.2.3 Influence du renouvellement de l'anolyte sur les performances des bioanodes, pour deux substrats différents (l'acétate et le glucose)

Un paramètre de fonctionnement important dans les stations d'épuration est la charge de polluant organique appliquée au procédé, c'est-à-dire la concentration en pollution par unité de temps. A l'anode de piles microbiennes, cette concentration en polluant est donc liée à une vitesse de renouvellement de l'eau à traiter par le biofilm anodique. Cette vitesse de renouvellement peut conditionner les performances des piles, car elle influence l'accumulation des espèces chimiques en solution. Les données de la littérature ne permettent pas de comprendre clairement si le renouvellement de l'anolyte est bénéfique ou néfaste aux performances des piles à combustible microbiologiques. Les travaux publiés dans la littérature suggèrent des effets contradictoires du renouvellement de l'anolyte. Ainsi, Rabaey et al. (2004) ont attribué l'augmentation des puissances délivrées au cours du temps par les piles à combustible microbiologiques à l'accumulation des médiateurs redox à l'anode (Logan et Regan 2006, Rabaey et al. 2004). D'autres études montrent qu'un renouvellement régulier, voire permanent de l'anolyte est bénéfique car il permet d'éviter l'accumulation des produits de la métabolisation, notamment de protons qui causent une acidification et donc à la fois une baisse d'activité du biofilm et une augmentation du potentiel anodique (Torres et al. 2008). Le

renouvellement régulier de l'anolyte permettrait aussi d'éviter le développement de communautés microbiennes indésirables pour un objectif de production d'électricité telles que les méthanogènes (Pinto et al. 2010). Il est difficile de comparer ces études car elles n'ont pas été réalisées sur les mêmes dispositifs, ni le même inoculum.

Notre démarche a donc été d'étudier *l'effet du renouvellement de l'anolyte* sur les performances des biofilms. Le renouvellement de l'anolyte a été testé pour deux substrats, l'acétate non fermentescible et le glucose fermentescible. Les résultats de cette étude seront discutés en **partie 3** de ce chapitre, après l'étude de *l'effet de la maturité des biofilms* sur le changement de substrat discuté ci-après en **partie 2**.

2 Etude de l'adaptation de biofilms anodiques de maturité différente face à des changements de substrats

L'ensemble des travaux discutés dans cette partie a été réalisée avec la configuration classique des piles en H (détaillée en section expérimentale en fin de chapitre) dans lesquelles anodes et cathodes étaient séparées par une membrane échangeuse de cations et reliées par une résistance de 1 k Ω . Afin de se concentrer sur les phénomènes anodiques, nous avons opté pour des cathodes abiotiques au ferricyanure (100 mM) stables et non limitantes.

La mise en place des piles a été identique pour l'ensemble de ces biofilms. Les biofilms sont développés à partir d'une même source mixte de bactéries : les boues d'aération de l'usine de Beaurade traitant les eaux usées de la ville de Rennes. Lors de la phase de développement des biofilms, le substrat fourni est l'acétate (4 mM) afin de favoriser une forte présence de bactéries électroactives dans le biofilm anodique. Au total, pour chaque substrat fermentescible, quatre piles sont étudiées. Pour deux piles, les premiers changements de substrat interviennent après 2 batchs consécutifs (soit 15 jours) sous acétate, c'est-à-dire que le biofilm y est donc encore jeune. Pour les deux autres piles, les premiers changements de substrats ont lieu après 16 batchs consécutifs (soit 3.5 mois) sous acétate. Les biofilms sont alors dominés par des bactéries électroactives de type *Geobacter* comme attesté par la couleur rose orangée de l'anolyte et des biofilms et ils sont appelés ici « biofilms matures ». Après cette phase de développement sous acétate, l'anolyte est remplacé et de nouveaux substrats sont fournis au biofilm, le glucose ou le lactose (structures **Figure 3**).

2.1 Temps de latence des bioanodes jeunes et matures face à un changement de substrat

Dans une culture microbienne classique de bactéries en suspension, le temps de latence correspond à la durée entre le moment où on ajoute le substrat et le moment où on commence à observer la multiplication des bactéries dans le milieu. Durant ce temps de latence, les bactéries présentes synthétisent l'ensemble des protéines et en particulier des enzymes nécessaires à la métabolisation du substrat disponible dans le milieu. Une fois ces enzymes bactériennes synthétisées, le substrat est consommé de façon efficace et l'énergie récupérée par les bactéries permet leur multiplication dans le milieu. Lorsque la communauté bactérienne est établie et habituée à un substrat donné, le temps de latence est la durée entre l'ajout du substrat et sa consommation effective par les bactéries. Cette durée correspond à un simple renouvellement des enzymes nécessaires à l'oxydation du substrat. Dans le cas des systèmes microbioélectrochimiques établis à l'anode de piles à combustible microbiologiques, les bactéries que l'on cherche à exploiter se développent sur un support solide, l'anode, et permettent la génération de courant à partir d'un substrat fourni. Ainsi, contrôler le courant délivré par les piles permet de mesurer i) la colonisation de l'anode par les bactéries en suspension et leur connexion au moment de la mise en place de la pile et ii) la consommation effective du substrat par un biofilm déjà développé (voir **Figure 4**)

Dans notre étude sur des biofilm développés, on désigne par temps de latence la durée entre l'ajout du substrat et le moment où la pile délivre un courant stable, comme indiqué sur le schéma suivant :

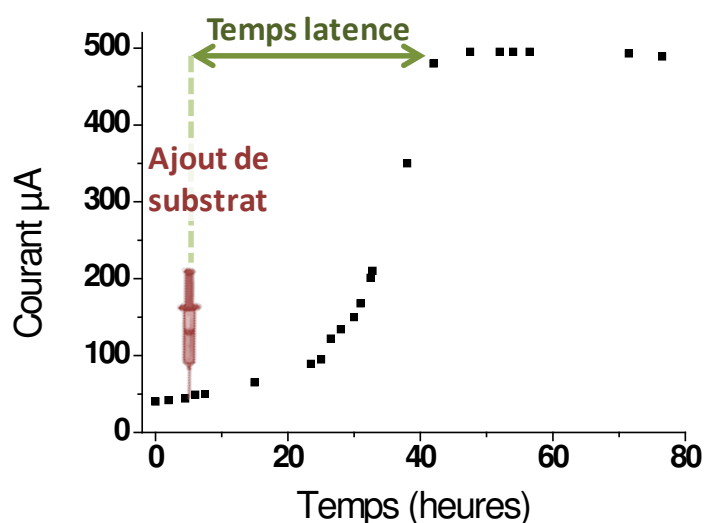


Figure 4 Notion de temps latence utilisé dans cette étude

Pour les piles que nous avons étudiées, dans le cas de l'acétate (4 mM, soit 0.1 g COT/L), substrat utilisé classiquement pendant le développement du biofilm électroactif, le temps de latence est de $1.5 \text{ h} \pm 0.1$ pour les biofilms matures et $2.1 \text{ h} \pm 0.8$ pour les biofilm jeunes. Ce temps de latence est court, il correspond à une augmentation presque immédiate du courant après l'ajout du substrat (voir **Figure 5** ci-dessous). Lorsqu'on change de façon soudaine l'acétate pour un substrat fermentescible, ici le glucose ou le lactose (0.1 g COT/L, respectivement 1.3 mM et 0.7 mM), ce temps de latence s'allonge et le courant n'augmente pas immédiatement après l'ajout du substrat. Afin d'illustrer ce phénomène, nous avons choisi de présenter le suivi en ligne du courant délivré d'une pile de l'expérience (voir figure ci-dessous). Il s'agit d'une pile comportant une bioanode mature (16 cycles de batchs d'acétate consécutifs), pour laquelle le substrat est changé pour du lactose.

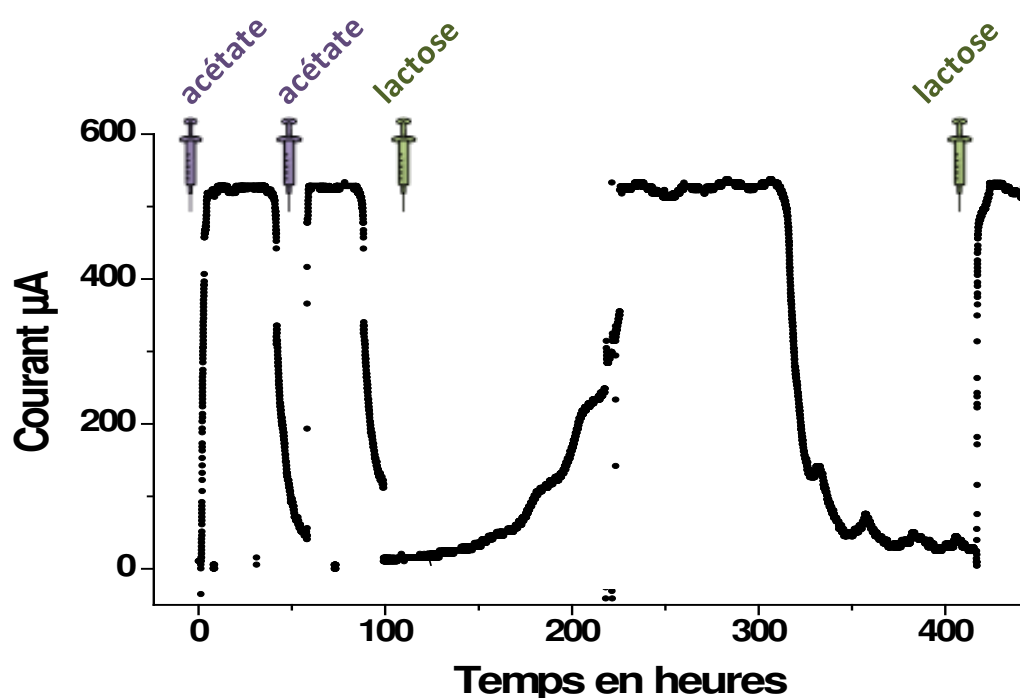


Figure 5 Suivi en ligne du courant délivré par une pile comportant un biofilm mature à l'anode (développement du biofilm par 16 batchs consécutifs d'acétate 0.1 g COT/L). Le début du suivi correspond à 2 batchs d'acétate (0.1 g COT/L). On constate que la génération d'électricité est presque immédiate après l'ajout d'acétate. Pour les batchs suivants, le substrat est changé pour un disaccharide fermentescible, le lactose (0.1 g COT/L). Lors du premier ajout de lactose, on constate que la réponse de la bioanode en termes de génération d'électricité est sensiblement allongée. Une fois que la bioanode a été acclimatée à ce nouveau substrat, le temps de réponse se raccourcit (voir paragraphe 2.2)

Les données de l'ensemble des piles de l'expérience sont présentées dans le **Tableau 1** ci-après.

Temps de latence lors du premier changement de substrat		
	Acétate → glucose	Acétate → lactose
Biofilms jeunes	17.5 ± 5 h	32 ± 8 h
Biofilms matures	26 ± 6 h	67 ± 12 h

Tableau 1 Temps de latence constatés après changement pour un substrat nouveau et fermentescible dans des bioanodes développées initialement sous acétate (2 cycles batchs pour les biofilms jeunes, 16 pour les biofilms matures). Les temps de latences indiqués sont des moyennes calculées à partir des temps mesurés pour deux piles identiques. Les quantités de substrat ajoutées sont réalisées de sorte que la concentration en carbone est la même pour chaque substrat soit 0.1 g COT/L.

L'allongement du temps de latence de quelques heures à plusieurs dizaines d'heures lorsque l'acétate est changé pour un substrat fermentescible correspond au développement de communautés bactériennes capables de fermenter les glucides ajoutés en acides gras volatils utilisables alors par les bactéries électroactives. Lorsque le substrat fourni est l'acétate pendant plusieurs batchs, les espèces prédominantes dans le biofilm et en solution sont des espèces électroactives (Yates 2012, Malvankhar et al. 2012, Dennis et al. 2013). Les espèces fermentaires non électroactives sont présentes mais leur concentration est faible et leur métabolisme ralenti. La proportion de ces bactéries fermentaires à l'anode diminue progressivement au fil des batchs d'acétate consécutifs au profit des bactéries électroactives. Ainsi, avant l'ajout de substrat fermentescible, le nombre de bactéries fermentaires serait plus important dans les piles où les biofilms sont jeunes que dans les piles où les biofilms sont matures.

Lorsque l'acétate ou le lactose sont ajoutés, la machinerie enzymatique des quelques bactéries fermentaires de l'anode se met en place et ces bactéries se multiplient. Une fois ces nouvelles communautés établies à l'anode, elles produisent les acides gras volatils permettant la production d'électricité par les bactéries électroactives du biofilm. Le temps de latence observé correspondrait donc majoritairement au temps nécessaire à la multiplication des bactéries fermentaires jusqu'à être en quantité suffisante pour une transformation rapide des substrats fermentescibles en acides gras volatils. Ce temps de latence dépend du nombre de bactéries fermentaires présentes en début de batch. En effet, on constate que ce temps d'adaptation à un substrat fermentescible nouveau est en moyenne doublé pour les biofilms matures par rapport aux biofilms jeunes. Dans les biofilms matures, la population de bactérie fermentaires de départ est plus faible que dans les biofilms jeunes. Le développement de ces bactéries pionnières jusqu'à une concentration de bactéries dans le biofilm et/ou dans l'anolyte suffisante pour la

dégradation efficace du glucose ou du lactose prend plus de temps, d'où les différences de temps d'adaptation selon la maturité des biofilms.

L'allongement des temps de latence suite à un changement de substrat est en accord avec les résultats d'une étude qui a été publiée pendant que nous réalisons nos propres travaux sur le sujet (Zhang et al. 2011). Dans cette étude, seuls des biofilms jeunes ont été étudiés (2 à 3 batchs consécutifs du même substrat avant le premier changement) et la concentration des substrats est de 1 g COT/L. Pour ces dispositifs utilisés, le temps de latence des bioanodes observé après ajout d'acétate est de quelques heures. Ce temps de latence s'allonge à 3 jours après changement de l'acétate pour le glucose fermentescible. Les auteurs montrent de plus que le glucose ajouté est transformé majoritairement en acétate et de façon moindre en propionate. Les concentrations de ces deux acides gras volatils dans le milieu varient de façon concomitante avec le courant délivré par la pile, ce qui suggère qu'il s'agit effectivement des intermédiaires utilisés par les bactéries directement impliqués dans la production de courant.

Ces résultats mettent en lumière que les communautés bactériennes peuvent s'adapter à l'ajout de nouveaux substrats. Mais ce temps d'adaptation peut être plus ou moins long suivant le nouveau substrat fourni et la diversité des bactéries présentes avant le changement. Par exemple, si le nombre de bactéries fermentaires est très faible, le temps de réponse à l'arrivée d'un substrat complexe est long. D'après ces résultats on peut imaginer que pour obtenir une bioanode s'adaptant rapidement à des substrats différents, il est important de maintenir un équilibre entre les communautés électroactives et les communautés fermentaires. Après cette phase d'adaptation, nous cherchons à évaluer les performances des bioanodes, une fois acclimatées au glucose ou au lactose. Ces performances des bioanodes pour la dégradation de substrats fermentescibles sont comparées aux performances mesurées lorsque le substrat est l'acétate.

2.2 Performances de bioanodes jeunes et matures pour l'oxydation de différents substrats fournis

Lorsque le substrat fermentescible (glucose ou lactose) est introduit pour la première fois à l'anode, le batch est un cycle d'adaptation. Des cycles batchs avec le même substrat fermentescible sont réalisés consécutivement afin de mesurer les performances des biofilms, une fois ceux-ci habitués au substrat. Les figures suivantes sont deux exemples de suivis du

courant et de la concentration en carbone organique total dans l'anolyte pour une bioanode acclimatée à l'acétate et une bioanode acclimatée au lactose.

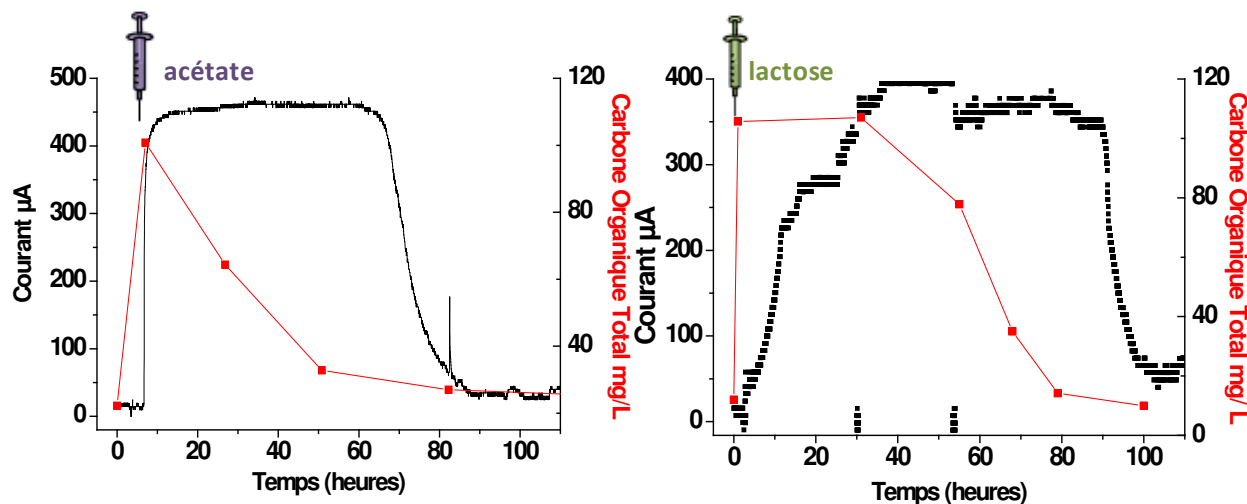


Figure 6 Suivis du **courant** et de la concentration en **COT** — dans l'anolyte pour une bioanode jeune acclimatée à l'acétate (gauche) et une bioanode jeune acclimatée au lactose (droite)

Le suivi de ces batchs permet de constater que la génération de courant par les bioanodes est bien couplée à une diminution de la pollution organique dans l'anolyte (**Figure 6**). En anticipant sur une partie de la discussion des résultats présentés ci après, on observe déjà que l'introduction d'un substrat fermentescible (le lactose) entraîne à la fois une baisse du courant délivré ainsi qu'une réponse plus lente des systèmes en termes de dépollution et de génération de courant, ce qui a déjà été décrit dans la littérature. Ces batchs permettent également de caractériser par voltamétrie cyclique, l'oxydation catalytique du substrat et l'électroactivité des protéines redox connectant les bactéries à l'électrode, en absence de substrat organique. Les concentrations en glucose et en lactose utilisées pour l'évaluation de l'efficacité de l'oxydation sont de 1.3 mM et 0.7mM respectivement, de telle sorte que la quantité de Carbone Organique Total (COT) ajouté soit identique quel que soit le substrat utilisé, soit 0.1 g COT/L. Pour les mesures de polarisation et de courants catalytiques, la concentration en COT est de 0.5 g /L, soit 20 mM d'acétate ou 6.5 mM de glucose ou 3.5 mM de lactose.

2.2.1 Rapidité des biofilms à dégrader le substrat, après acclimatation

A la suite du premier ajout de substrat fermentescible, glucose ou lactose, les différentes communautés de bactéries nécessaires à l'oxydation des substrats fermentescibles s'établissent à l'anode. Les temps de latence allongés lors du premier ajout ont été attribués à la mise en

place de cette syntrophie anodique. On peut donc supposer que lors du second ajout de substrat, ces temps de latence sont plus courts. Les bactéries fermentaires sont en nombre suffisant pour dégrader immédiatement le glucose ou le lactose en acide gras volatils qui sont alors oxydés par les bactéries électroactives en générant de l'électricité. En effet, on constate bien que les temps de latence diminuent fortement lors du second ajout (voir exemple **Figure 6** et le **Tableau 2** ci-dessous pour l'ensemble des résultats).

Temps de latence des biofilms acclimatés au substrat			
	Acétate → acétate	Glucose → glucose	Lactose → lactose
Biofilms jeunes	2.1 ± 0.8 h	7 ± 2 h	17 ± 3 h
Biofilms matures	1.5 ± 0.1 h	5 ± 2 h	12 ± 1.5 h

Tableau 2 Temps de latence constatés après ajout de substrats auxquels les biofilms ont été acclimatés (2 cycles batchs pour les biofilms jeunes, 16 cycles pour les biofilms matures). Les temps de latences indiqués sont des moyennes calculées à partir des temps mesurés pour deux piles identiques. Les quantités de substrat sont ajoutées de sorte que la concentration en carbone est la même pour chaque substrat soit 0.1 g COT/L

Ici, les ajouts ultérieurs de substrats fermentescibles ne font que réactiver le métabolisme des bactéries fermentaires et électroactives. En revanche, on constate que ces temps de latence sont significativement plus longs pour des substrats fermentescibles par rapport au temps de latence observé avec l'acétate, un substrat directement utilisable par les bactéries électroactives. Ce temps de latence plus long dans le cas des substrats fermentescibles serait donc lié à la l'étape supplémentaire de fermentation du glucose ou du lactose en acides gras volatils avant la génération d'électricité. Ainsi la fermentation et l'acheminement des produits de la fermentation jusqu'aux bactéries électroactives semblent être, dans ce cas, des étapes limitantes dans le processus de production de courant électrique. De plus, lorsque les communautés sont établies pour l'oxydation anodique de substrats fermentescibles, le temps de latence est légèrement plus court pour les biofilms matures que pour les biofilm jeunes. Cela suggère que les mécanismes d'oxydation de ces biofilms riches en bactéries électroactives sont plus efficaces que sur les biofilms plus jeunes. En effet, l'efficacité de la syntrophie entre bactéries fermentaires et bactéries électroactives dépend d'un équilibre entre les deux communautés bactériennes. Les bactéries fermentaires peuvent se développer dans l'ensemble du compartiment anodique, soit dans l'anolyte et sur le biofilm. Les bactéries électroactives sont contraintes de se développer à l'anode qui est leur accepteur d'électrons (Lee et al. 2008). Si la quantité de bactéries électroactives n'est pas suffisante par rapport à la quantité de bactéries fermentaires, les produits de la fermentation s'accumulent. Cette accumulation peut avoir deux

conséquences négatives : un détournement du substrat vers les microorganismes méthanogènes et un ralentissement des vitesses de fermentation. Au contraire, lorsque les bactéries électroactives sont abondantes, les produits de la fermentation sont acheminés rapidement vers une oxydation anodique permettant une production d'électricité et un maintien de cinétiques rapides de fermentation (Freguia et al. 2008).

Ces résultats mettent en lumière que lorsque les communautés bactériennes anodiques sont adaptées à un substrat, le caractère mature du biofilm permet une dégradation rapide des substrats fournis. Ce caractère mature du biofilm est lié à la prédominance de bactéries électroactives, d'après ce qui est décrit par de nombreux papiers de la littérature. Il semble donc que pour permettre une syntrophie optimale, il faut garantir un équilibre entre bactéries fermentaires et bactéries électroactives. Comme les bactéries fermentaires ont peu de contraintes de développement dans l'anolyte et se développent donc rapidement, cet équilibre est assuré si un grand nombre de bactéries électroactives est présent à l'anode.

Les temps de réponse des bioanodes à l'introduction de substrats complexes est une première mesure de performances des systèmes de conversion des substrats en électricité, une autre mesure, discutée ci-après, est l'efficacité faradique.

2.2.2 Efficacités faradiques

Un moyen de caractériser les performances d'une pile à combustible est d'évaluer la part de substrat réellement utilisée pour la génération du courant. Ce rendement est appelé efficacité faradique et représente le rapport entre la quantité de charge potentiellement libérable par les composés oxydables fournis aux bactéries et la quantité de charge effectivement récupérée en électricité à travers le circuit externe.

Le courant délivré par les piles est suivi au cours du temps après l'ajout d'une quantité connue de substrat et jusqu'à son entière consommation par les bactéries du réacteur. La charge théorique fournie par le substrat est calculée à partir de l'équation d'oxydation complète du substrat utilisé en CO_2 :

- Acétate : $\text{CH}_3\text{COOH} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{CO}_2 + 8 \text{H}^+ + 8\text{e}^-$
- Glucose : $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 6 \text{CO}_2 + 24 \text{H}^+ + 24\text{e}^-$
- Lactose : $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} + 13 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 12 \text{CO}_2 + 48 \text{H}^+ + 48 \text{e}^-$

Elle se calcule en multipliant la constante de Faraday par le nombre d'électrons échangé par mole de substrat fourni dans le batch. Le calcul est résumé par la relation ci-dessous et le schéma suivant :

$$Q_{\text{fournie}} = n_{\text{substrat}} (\text{moles}) \times \text{nombre d'électrons échangés} \times \mathcal{F}$$

La charge qui est récupérée sous forme d'électricité se calcule en intégrant le courant généré consécutivement à l'ajout de substrat en fonction du temps de batch.

$$Q_{\text{récupéré}} = \int I dt$$

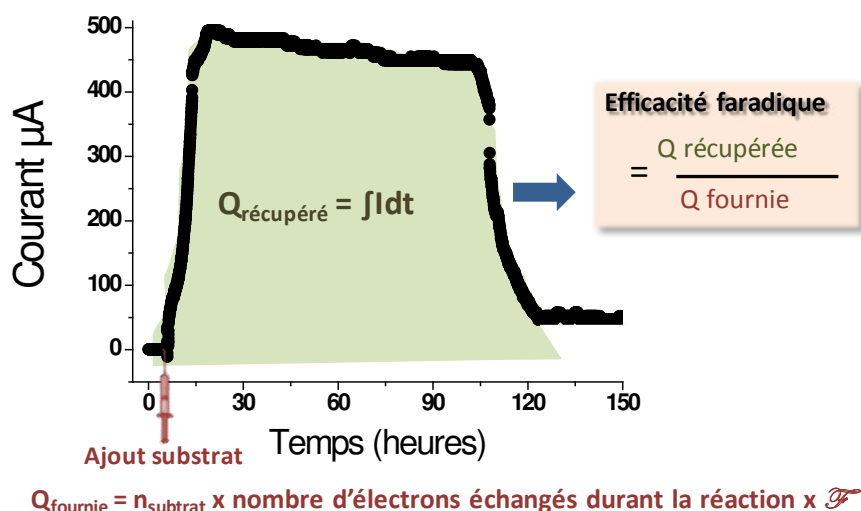


Figure 7 Schéma illustrant la notion de rendement faradique pour une PCM en mode batch

Pour chaque substrat, au moins deux batchs sont suivis et les rendements faradiques sont calculés et présentés dans le **Tableau 3** ci-après.

Efficacités faradiques calculées pour les différents substrats étudiés			
	Acétate	Glucose	Lactose
Biofilms jeunes	11 ± 1 %	12 ± 1 %	12 ± 1 %
Biofilms matures	14 ± 2 %	13 ± 2 %	14 ± 2 %

Tableau 3 Rendements faradiques calculés pour les différents substrats utilisés dans cette étude. Le calcul du rendement est réalisé sur 2 batchs consécutifs d'un même substrat et pour 2 piles, la moyenne de ces quatre mesures est reportée dans le tableau. Pour les deux batchs pris en compte, les communautés bactériennes sont déjà acclimatées au substrat utilisé. Les expériences ont été réalisées sur des piles dont les bioanodes sont jeunes (développement initial du biofilm lors de 2 batchs successifs d'acétate) et des piles dont les bioanodes sont matures (développement initial du biofilm lors de 16 batchs successifs d'acétate)

Les efficacités faradiques obtenues pour nos piles sont de l'ordre de 10% ce qui est plutôt faibles par rapport aux valeurs rapportées pour d'autres configurations de piles optimisées et qui sont de l'ordre de 60-80%, voire 100% dans le cas de l'acétate, le substrat le mieux adapté aux

bactéries électroactives. Les pertes d'efficacité faradiques sont dues aux à la conversion du substrat par des réactions ne générant pas d'électricité : oxydation du substrat par de l'oxygène diffusant dans l'anode, croissance des bactéries de l'anode (électroactives, fermentaires, méthanogènes) ou encore oxydation du substrat pour la méthanogénèse. Les cinétiques du métabolisme des bactéries électroactives jouent un rôle important dans l'efficacité faradique car de ces cinétiques dépendent l'avantage compétitif des bactéries électroactives sur d'autres espèces indésirables comme les méthanogènes (Hamelers et al. 2010). Sur les piles que nous avons étudiées, on constate que pour un même type de biofilm, le passage à un substrat fermentescible n'influence pas de manière significative l'efficacité faradique malgré la multiplication des intermédiaires réactionnels et des intermédiaires bactériens. L'absence de différences significatives sur nos systèmes suivant les substrats tiendrait du fait que d'autres paramètres tels que la configuration des piles ont un impact plus important et limiteraient les efficacités faradiques à des valeurs basses quelque soit le substrat. Jung et Regan (2007) montrent par exemple que l'effet du substrat sur les performances des piles est moins prononcé pour des piles à configuration non optimisée et présentant une résistance interne élevée, ce qui est notre cas (300-500 Ω).

Néanmoins, on note une différence entre l'efficacité faradique d'un biofilm jeune et celle d'un biofilm mature. Quelque soit le substrat, l'efficacité faradique moyenne obtenue avec des biofilms matures est supérieure à celle obtenue avec des biofilms jeunes. Ces résultats sont en accord avec notre discussion précédente sur la rapidité des bioanodes matures à oxyder des substrats. Dans les biofilms matures, c'est-à-dire développés après plusieurs batchs d'acétate, les bactéries électroactives sont majoritaires d'après ce qui est décrit dans la littérature. Cette grande quantité de bactéries électroactives par rapport aux microorganismes ne participant pas directement à la génération d'électricité permet une conversion plus rapide et plus efficace des substrats en électricité que dans le cas de biofilms jeunes moins riches en bactéries électroactives.

Un autre moyen de caractériser les piles est de s'intéresser aux performances électriques en effectuant des courbes de polarisation. Ces courbes permettent de connaître les puissances maximales délivrées ainsi que les limitations des piles. Nous cherchons à comparer les performances électriques des biofilms matures et des biofilms jeunes.

2.2.3 Puissances maximales des piles et leurs limitations

Les performances électriques des biofilms acclimatées aux différents substrats testés ont été évaluées par courbes de polarisation. Les mesures de polarisation sont réalisées dans des conditions où la concentration en substrat ne limite pas la puissance délivrée par la pile, soit une concentration de 0.5 g COT/L (20 mM d'acétate de potassium, 6.5 mM de glucose, 3.5 mM de lactose). Cette courbe est la représentation de la différence de potentiel, du potentiel de l'anode ou du potentiel de la cathode en fonction du courant délivré par la pile.

Les courbes de polarisation peuvent être réalisées soit à l'aide d'une résistance variable et d'un voltmètre, soit à l'aide d'un potentiostat. Plusieurs différences de potentiel (DDP) entre l'anode et la cathode sont appliquées à la pile pendant un temps donné, de la DDP à circuit ouvert à la DDP proche du court-circuit, et le courant délivré par la pile correspondant est relevé lorsqu'il atteint un palier. A chacun de ces paliers, les potentiels anodiques et cathodiques peuvent être relevés en utilisant une électrode de référence. Les paliers sont maintenus suffisamment longtemps pour que les mesures soient prises lorsque le courant est stationnaire.

L'analyse des courbes de polarisation permet de comprendre les paramètres limitant les performances de la pile, notamment les surtensions des réactions à l'électrode, la résistance interne ou encore la diffusion du substrat. A partir de ces données, on peut aussi obtenir la puissance en fonction du courant, en calculant le produit de la DDP et du courant ($P = DDP \times I$). A circuit ouvert, les électrons ne circulent pas à travers le système, le courant et la puissance de la pile sont nuls. Lorsque la DDP diminue, la puissance augmente avec le courant jusqu'à un maximum. A partir de ce point, la puissance diminue à cause des pertes ohmiques et des limites croissantes à l'anode et à la cathode. La puissance maximale renseigne sur les performances électriques de la pile. Afin de comparer différentes piles entre elles, on rapporte cette valeur de puissance maximale à la surface projetée de l'anode ; on parle alors de densité de puissance maximale. Le schéma suivant, **Figure 8**, résume les paramètres renseignés par la courbe de puissance et la courbe de polarisation

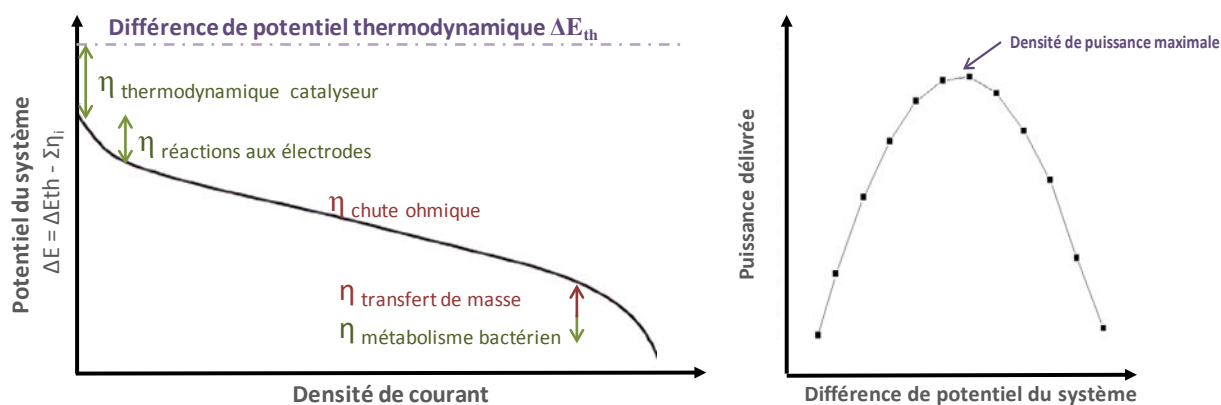


Figure 8 Courbe de polarisation et courbe de puissance schématique et paramètres mesurés dans l'étude

Les tableaux suivants résument les paramètres importants renseignés par les courbes de polarisations effectuées sur les deux types de biofilms et pour chaque substrat testé. Les résultats sont discutés sur deux tableaux, l'un (**Tableau 4**) regroupant les résultats obtenus sur des biofilms jeunes (développement initial du biofilm lors de 2 batchs successifs d'acétate) et l'autre (**Tableau 5**) regroupant les résultats obtenus sur des biofilms matures (développement initial du biofilm lors de 16 batchs successifs d'acétate).

Puissance et limites des piles à biofilms jeunes suivant les différents substrats étudiés			
	Acétate	Glucose	Lactose
Puissance maximale moyenne	$132 \pm 21 \text{ mW.m}^{-2}$	$91 \pm 8 \text{ mW.m}^{-2}$	$109 \pm 2 \text{ mW.m}^{-2}$
Résistance interne	$348 \pm 22 \Omega$	$443 \pm 16 \Omega$	$389 \pm 14 \Omega$
Surtensions réactions ou limite de diffusion	—	—	—

Tableau 4 Performances des piles à bioanode jeune (développement initial du biofilm lors de 2 batchs successifs d'acétate) en présence d'une concentration non limitante de substrat, soit 0.5 g COT/L, évaluées par mesure de polarisation et puissance. Trois paramètres sont pris en compte : la puissance maximale délivrée, la résistance interne (pente de la partie linéaire de la courbe de polarisation, présence de chutes de potentiel importantes aux faibles courants (surtensions) ou présence de chutes de potentiel importants (limites liées à la diffusion du substrat. remarque : l'anolyte n'est pas agité)

Contrairement à ce qui est observé pour l'efficacité faradique, on observe que la nature du substrat a un impact significatif sur la puissance maximale des piles. Lorsque le substrat est fermentescible, les puissances maximales délivrées sont plus faibles que lorsque l'acétate est utilisé. Ce phénomène a déjà été observé pour le glucose (Velasquez-Orta et al. 2011, Jung et Regan, 2007, Zhang et al. 2011). En étudiant les courbes de polarisation, on constate que la

diminution des puissances maximales délivrées, va de pair avec une augmentation de la résistance interne des piles (**Tableau 4**). La résistance interne de la pile représente la résistance aux transferts des électrons et/ou des ions dans les différents compartiments de la pile : les matériaux d'électrodes, les contacts électriques, le biofilm anodique, l'anolyte et la membrane échangeuse de protons. Dans notre cas, il est probable que l'introduction de substrats fermentescible modifie la résistance i) au transfert des ions à travers la membrane ou ii) au transfert des électrons dans le biofilm anodique. Ces deux hypothèses sont discutées ci-après au regard de nos propres résultats et de données récentes de la littérature.

i) L'introduction de substrats fermentescibles peut entraîner le développement de bactéries dans l'ensemble de l'anolyte et notamment sur la membrane échangeuse de cation séparant le compartiment anodique du compartiment cathodique. Ce développement entraîne un colmatage des pores de la membrane, ce qui diminue le transport des ions entre les deux compartiments et augmente la résistance interne de la pile. Le développement bactérien sur la membrane est favorisé par la diffusion d'oxygène de la cathode vers l'anode au travers de la membrane (Kim et al. 2006). Dans notre cas, nous avons remplacé la membrane échangeuse de cations dans une pile à bioanode jeune catalysant l'oxydation du glucose. Nous avons constaté une augmentation légère de la puissance délivrée (100 mW.m^{-2} contre 92 mW.m^{-2} avant remplacement) mais qui n'atteint pas les puissances observées avec l'acétate (de l'ordre de 130 mW.m^{-2}). Cette observation suggère que les baisses de performances peuvent en partie être attribuées à un transport des charges entravé dans la membrane échangeuse de cations des piles, mais que des éléments autres que le colmatage de la membrane augmentent la résistance interne de la pile. Des données récentes de la littérature suggèrent que le transport des électrons dans le biofilm peut expliquer l'augmentation la résistance interne de la pile constatées dans nos dispositifs après changement de substrat.

ii) L'arrivée de substrats fermentescibles entraîne le développement de nouvelles espèces bactériennes en surface du biofilm électroactif (Malvankhar et al. 2012, Freguia et al. 2008, Kiely et al. 2011). Ce deuxième développement bactérien à l'anode peut avoir des conséquences sur la conductivité de la bioanode. En effet, Malvankhar et al. (2012) montrent que la conductivité des biofilms électroactifs est corrélée aux courants délivrés et dépend des souches de bactéries utilisées. De plus, d'autres auteurs ont montré que cette conductivité diminue avec l'épaisseur du biofilm (Renslow et al. 2013). On peut donc penser que le développement d'espèces bactériennes non électroactives et pas forcément conductrices (Malvankhar et al. 2012) à la bioanode, augmentent la résistance au transfert de charge dans le biofilm et participent pour

beaucoup à l'augmentation de la résistance interne des piles quand les substrats fournis sont fermentescibles.

Un autre résultat assez remarquable que l'on peut noter est la baisse des puissances maximales délivrées plus prononcée pour le glucose que pour le lactose. Les puissances maximales obtenues avec le lactose sont proches de celles obtenues avec l'acétate. La fermentation du lactose est susceptible de produire plusieurs acides gras volatils utilisables par les bactéries électroactives, dont le lactate, tandis que la fermentation du glucose produit majoritairement de l'acétate. Or, Jung et Regan (2007) montrent que les puissances délivrées par les biofilms anodiques sont similaires voire supérieures avec du lactate qu'avec de l'acétate. Speers et Reguera (2012) ont montré que les biofilms développés initialement avec de l'acétate présentaient de meilleures performances lorsque le substrat était changé pour du lactate que lorsque l'acétate était gardé comme substrat. La génération de lactate par les bactéries fermentaires est une explication probable des meilleures performances obtenue en fournissant du lactose plutôt que de glucose.

Lorsque les biofilms sont matures, on observe les mêmes tendances d'augmentation et de baisse des puissances maximales que pour les biofilms jeunes : l'acétate entraîne les puissances maximales les plus élevées, puis le lactose et enfin le glucose pour lequel on obtient les plus basses puissances maximales, comme résumé dans le **Tableau 5** ci-dessous :

Puissance et limites des piles à biofilms matures suivant les différents substrats étudiés			
	Acétate	Glucose	Lactose
Puissance maximale moyenne (mW.m⁻²)	82 ± 5 mW.m ⁻²	58 ± 17 mW.m ⁻²	68 ± 6 mW.m ⁻²
Résistance interne (Ω)	406 ± 13 mW.m ⁻²	556 ± 17 mW.m ⁻²	502 ± 11 mW.m ⁻²
Limites remarquables	Transport de masse	Transport de masse	Transport de masse

Tableau 5 Performances des piles à bioanode mature (développement initial du biofilm lors de 16 batchs successifs d'acétate) en présence d'une concentration non limitante de substrat, soit 0.5 g COT/L évaluées par mesure de polarisation et puissance. Trois paramètres sont pris en compte : la puissance maximale délivrée, la résistance interne (pente de la partie linéaire de la courbe de polarisation, présence de chutes de potentiel importantes aux faibles courants (surtension) ou présence de chutes de potentiel importants (limites liées à la diffusion du substrat, remarque : l'anolyte n'est pas agité)

Cependant, l'ensemble des puissances maximales obtenues sur les biofilms matures est inférieur à ce qu'on mesure sur biofilms jeunes. Cette observation peut sembler paradoxale car pour ces biofilms matures, nous avons observé de meilleures efficacités faradiques et un temps

de latence réduit une fois que les communautés bactériennes s'étaient établies. Ces meilleures performances avaient été attribuées à la forte proportion de bactéries électroactives dans ces biofilms. Ici, on observe un effet négatif de la maturité des biofilms. On constate que les puissances plus faibles pour les biofilms matures sont liées à une résistance interne augmentée et surtout à une limite forte des bioanodes liés au transfert de masse à l'anode. Ces observations sont en accord avec notre hypothèse formulée plus haut : l'augmentation de la résistance interne des piles lors de l'ajout de substrats fermentescibles peut être majoritairement attribuée à une diminution de la conductivité des biofilms à l'anode. Les bioanodes matures sont des biofilms développés à partir 16 batchs d'acétate. Ces bioanodes sont donc en fonctionnement depuis plus de trois mois avant les premiers changements de substrat (contre 15 jours pour les biofilms jeunes). Cette longue période de fonctionnement est susceptible de former des biofilms épais et riches en bactéries électroactives. Pendant longtemps les biofilms électroactifs ont été modélisés comme étant uniformément conducteurs dans l'ensemble de leur épaisseur. Récemment, ce modèle des biofilms a été bouleversé. Des chercheurs ont développé de nouveaux montages expérimentaux permettant de comprendre les flux et l'activité métabolique dans l'épaisseur d'un biofilm électroactif (Renslow et al. 2013). Ces études montrent que le développement des biofilms jusqu'à une épaisseur de 170 μm est associé à une augmentation du courant délivré ; lorsque le biofilm se développe au-delà de cette épaisseur, on assiste à une diminution du courant délivré. Les auteurs montrent que cette baisse du courant délivré est liée à la fois à une augmentation de la résistance au transfert des électrons et à une baisse de la diffusion de substrat dans les biofilms. Dans des biofilms épais, seulement 63 % de la partie supérieure du biofilm a accès à l'acétate ajouté dans l'anolyte. La partie du biofilm proche de l'anode n'a pas accès à l'acétate et est composée de bactéries mortes. Ces bactéries mortes continuent de conduire le flux d'électrons générés dans la partie supérieure du biofilm jusqu'à l'électrode mais augmentent la résistance au transfert des électrons à l'anode. La présence de bactéries mortes au sein du biofilm avait été mise en évidence auparavant par Marcus et al. (2007) mais les conséquences de cette présence n'avaient pas été discutées.

Ce nouveau modèle permet d'expliquer à la fois que la résistance interne de nos piles et les limites liées au transport de masse sont augmentées lorsque les bioanodes sont matures. Ce phénomène est encore plus marqué lorsque les substrats sont fermentescibles car on assiste au développement de couches supplémentaires de microorganismes fermentaires et méthanogènes pas forcément conducteurs sur le biofilm électroactif. Ce développement des bactéries non électroactives est d'ailleurs visible à l'œil nu sur les bioanodes. Après les 16 batchs

d'acétate, les biofilms sont de couleur rose orangé, typique de la présence de bactéries électroactives de type *Geobacter*. Lorsque des substrats fermentescibles sont fournis, la surface du biofilm prend une couleur marron- grise lié au développement d'autres espèces bactériennes. Ces espèces bactériennes sont des bactéries probablement responsables de la fermentation des substrats en acides organiques utilisables par les bactéries électroactives (Malvankhar et al. 2012). Sur les biofilms matures, le développement supplémentaire de bactéries entraîne des transports de masse et une conductivité très limités. Ce phénomène est d'ailleurs corroboré par les observations de l'oxydation catalytique des substrats et de l'électroactivité des biofilms par voltamétrie cyclique, présentés dans le paragraphe ci-après.

2.2.4 Courants catalytiques maximaux délivrés par les bioanodes

La connexion des bactéries électroactives à l'anode est réalisée grâce à une série de réactions faisant intervenir de nombreux cytochromes, protéines, médiateurs redox solubles ou liés à la membrane. Un moyen d'étudier ces réactions à l'électrode est la voltamétrie cyclique. Lorsque des enzymes redox interagissent avec une électrode, la relation entre le potentiel appliqué et le courant délivré par l'électrode de travail peut renseigner sur les cinétiques de transfert électronique, les réactions limitantes et les stœchiométries des réactions. La voltamétrie cyclique consiste à appliquer à un système, ici la bioanode, un potentiel variant de façon linéaire entre une valeur initiale et une valeur limite puis de cette valeur limite à la valeur initiale. On mesure la réponse du système sous forme de courant. Dans notre cas, il est intéressant de procéder à la voltamétrie cyclique à faible vitesse de balayage dans deux cas : en présence de substrat ou en l'absence de substrat (voir exemple **Figure 9**). Dans le premier cas, on observe la catalyse de l'oxydation du substrat ; dans le second, on observe l'électroactivité des protéines redox de surfaces impliquées dans le transfert électronique.

Les voltamétries cycliques sont effectuées *in situ* sur la bioanode, qui est alors l'électrode de travail. Dans les mesures présentées ci-après, la contre-électrode est la cathode et l'électrode de référence utilisée est l'électrode au calomel saturé (ECS). La vitesse de balayage utilisée est de 1 mV.s^{-1} . Cette faible vitesse est adaptée aux cinétiques des réactions métaboliques des bactéries.

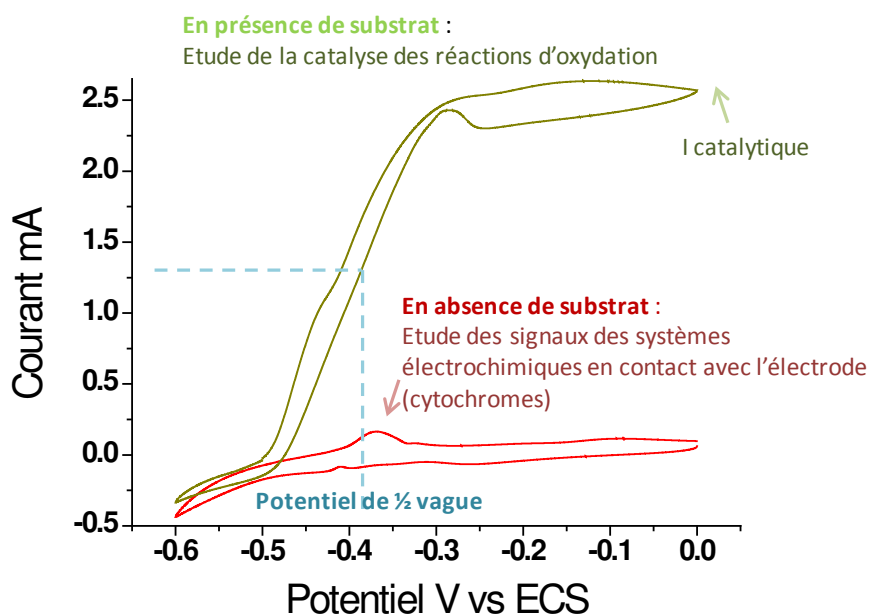


Figure 9 Exemple de voltamogramme que l'on peut obtenir en présence ou en absence de substrat dans l'anolyte. Ici exemple d'un biofilm jeune dont le substrat est l'acétate (20 mM). Vitesse de balayage : 1 mV.s^{-1}

Les courants catalytiques dus à l'oxydation des substrats que nous mesurons sur les bioanodes de l'étude (**Tableau 6**) reflètent les résultats obtenus précédemment par les courbes de polarisation.

Densités de courant catalytiques selon les différents substrats étudiés			
	Acétate	Glucose	Lactose
Biofilms jeunes	$1.22 \pm 0.2 \text{ A.m}^{-2}$	$0.67 \pm 0.2 \text{ A.m}^{-2}$	$0.74 \pm 0.4 \text{ A.m}^{-2}$
Biofilms matures	$0.33 \pm 0.03 \text{ A.m}^{-2}$	$0.27 \pm 0.03 \text{ A.m}^{-2}$	$0.30 \pm 0.02 \text{ A.m}^{-2}$

Tableau 6 Densités de courants catalytiques due à l'oxydation du substrat à l'anode, mesurés par voltamétrie cyclique à vitesse de balayage lente à 1 mV.s^{-1} . Les voltamétries cycliques sont réalisées en présence d'une concentration non limitante de substrat, soit 0.5 g COT/L . La valeur du courant catalytique est prise sur le plateau de courant observé sur les voltamogrammes. Les valeurs relevées sont prises à 0 V vs ECS et ramenées à la surface projetée des anodes (ici, de l'ordre de 30 cm^2)

Tout d'abord, on observe le même phénomène concernant l'influence du substrat sur les valeurs des courants catalytiques : les valeurs les plus élevées étant observées pour l'acétate, puis le lactose et enfin le glucose, et ce, quelque soit l'âge du biofilm.

D'autre part, on peut constater la différence entre les biofilms matures et les biofilms jeunes : les courants catalytiques délivrés par les biofilms jeunes sont entre deux et trois fois supérieurs à ceux délivrés par un biofilm mature. Afin d'expliquer ces différences de performances entre biofilms jeunes et biofilms matures, nous avons émis l'hypothèse d'une conductivité diminuée

des biofilms. Cette hypothèse était par ailleurs étayée par l'allure des courbes de polarisation réalisées sur les piles à bioanodes matures. L'analyse des voltamogrammes réalisés sur les bioanodes en présence d'une concentration non limitante d'acétate (0.5 g COT/L), substrat directement oxydable par les bactéries électroactives corrobore cette hypothèse. En effet, en comparant les voltamogrammes de l'oxydation de l'acétate sur les deux types de biofilm (voir **Figure 10**), on constate que la pente liée à l'augmentation du courant par catalyse bactérienne de l'oxydation de l'acétate est moins forte dans le cas des biofilms matures et que le plateau de courant obtenu est plutôt un pseudo-plateau avec une augmentation légère mais continue du courant. Cette allure du courant est en accord avec une résistance au transfert des électrons augmentée et donc un ralentissement de la génération de courant à l'anode.

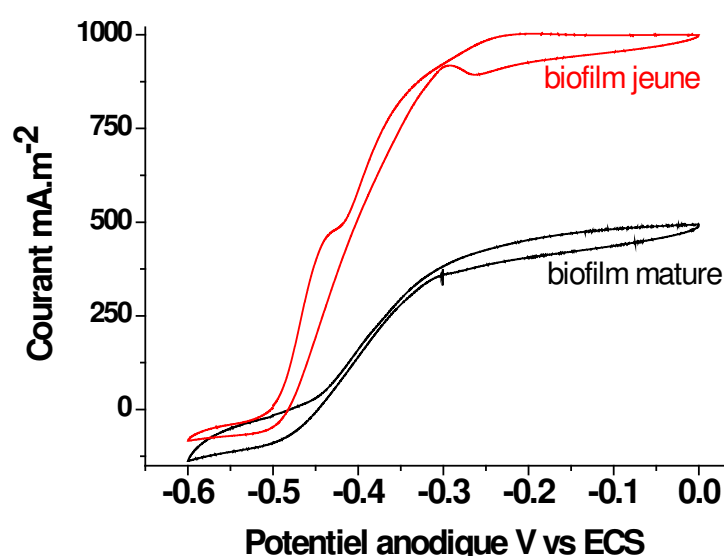


Figure 10 Oxydation de l'acétate (0.5 g COT/L) sur un biofilm mature (noir) et un biofilm jeune (rouge) étudié par voltamétrie cyclique dans l'anolyte. vitesse de balayage : 1 mV.s^{-1}

De plus, le potentiel seuil de l'oxydation du substrat semble être décalé vers des potentiels positifs sur le biofilm mature. Il passe de -0.5 V vs ECS sur le biofilm jeune à -0.45 V vs ECS sur le biofilm mature. Ce décalage peut être une conséquence supplémentaire de la baisse de conductivité dans les biofilms épais et matures. Cette conductivité diminuée peut en effet augmenter les surtensions des réactions à l'anode d'après les mesures d'impédance réalisées par Malvankhar et al. (2012) sur des biofilms de différentes conductivités. L'analyse des voltamogrammes d'oxydation de l'acétate est en accord avec l'analyse des courbes de polarisation, c'est-à-dire que dans les biofilms matures, les performances électriques sont limitées en majorité par le transfert des électrons dans l'épaisseur du biofilm.

2.2.5 Electroactivité des molécules redox connectant le biofilm à l'anode suivant le substrat fourni

Afin d'observer l'électroactivité des molécules redox permettant aux biofilms d'être connectés à l'anode, on peut effectuer des voltamétries cycliques sur les bioanodes lorsque le substrat a été complètement consommé. Sur les biofilms matures, le courant capacitif est très important et masque en grande partie ces signaux. Sur les biofilms jeunes, ces signaux sont bien définis, comme on peut le constater sur le voltamogramme suivant **Figure 11**.

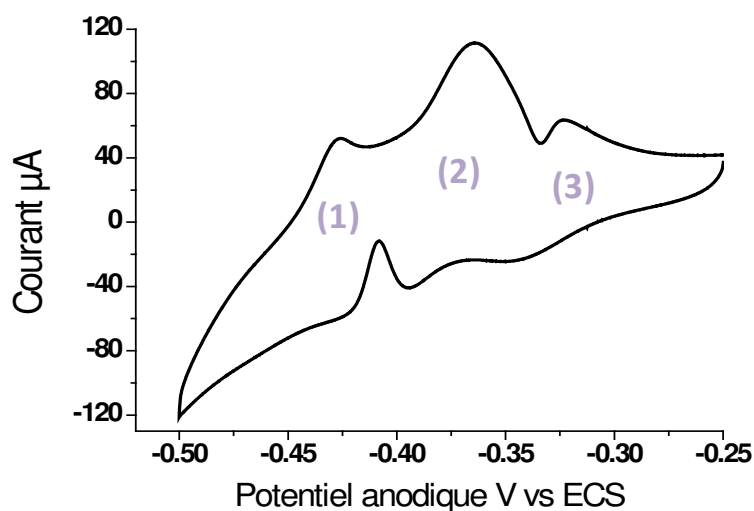


Figure 11 Voltamogramme d'un biofilm dans un anolyte fraîchement préparé et exempt de substrat (tampon phosphate 20mM, pH 7). La bioanode étudiée ici a subi auparavant 2 batchs d'acétate (biofilm jeune). Vitesse de balayage : 1 mV.s^{-1}

L'allure du voltamogramme est typique de ce qui est publié dans les études d'anodes enrichies ou développées à partir de souche de *G. sulfurreducens* (Fricke et al. 2008, Katuri et al 2010, Jain et al. 2011). L'étude du biofilm par voltamétrie cyclique permet de distinguer au moins trois systèmes redox ; un système noté (1) autour de -0.45 V vs ECS , un système (2) autour de -0.38 V vs ECS et un système (3) autour de -0.33 V vs ECS . Un quatrième système, peut visible sur la **Figure 11**) peut aussi être détecté autour de -0.47 V vs ECS , mais ne sera pas discuté par la suite. L'intensité du courant de pic est à relier avec la quantité de protéines redox connectées à l'anode. Les biomolécules redox correspondantes aux pics observés ne sont pas identifiées, néanmoins il est probable que chaque couple redox corresponde à plusieurs protéines redox ayant des potentiels proches.

Comparaison des voltamogrammes en fonction du substrat fourni

En comparant les voltamogrammes du biofilm sous les trois substrats testés (voir **Figure 12**), on constate que l'allure des voltamogrammes est la même, ce qui suggère que les intermédiaires

électroactifs utilisés ne changent pas en fonction du substrat fourni. Cependant, les courants de pics des systèmes varient suivant le substrat utilisé.

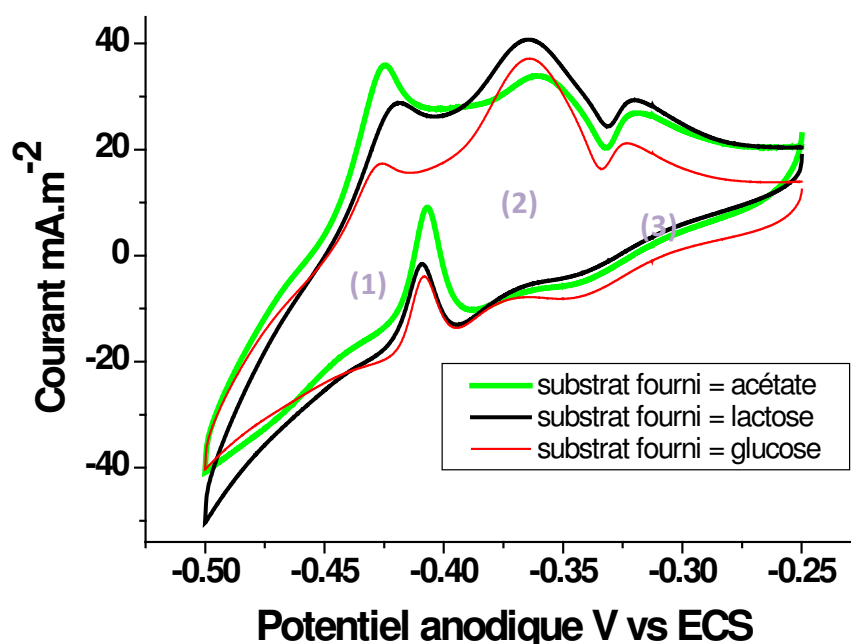


Figure 12 Voltammogrammes enregistrés dans un analyte fraîchement préparé dépourvu de substrat (pH 7.2) sur un biofilm jeune. Le substrat fourni indiqué est le substrat utilisé au batch n-1. Vitesse de balayage : 1 mV.s⁻¹

La principale différence que l'on remarque sur les voltammogrammes est le rapport du courant de pic d'oxydation du système (2) sur le courant de pic d'oxydation du système (1). En effet, il semble que ce rapport augmente lorsque le biofilm a été utilisé pour l'oxydation de substrats fermentescibles (intensité du pic d'oxydation du système (2) augmente tandis que l'intensité du pic du système (1) diminue). Il existe peu de données publiées présentant des voltammogrammes des systèmes redox permettant la connexion de biofilms mis en présence de différents substrats. Les voltammogrammes présentées ci-dessus pourraient suggérer que l'oxydation de substrats fermentescibles favorise une voie de transfert des électrons différente de celle utilisée lorsque l'acétate est oxydé. Cette voie de transfert privilégiée fait intervenir de façon importante un système redox (2) dont le potentiel est plus élevé que le système redox (1) privilégié lors de l'utilisation de l'acétate. Ce potentiel plus élevé pourrait expliquer les baisses de puissances maximales délivrées par les bioanodes oxydant des substrats fermentescibles.

Comparaison des voltammogrammes avant et après remplacement de l'anolyte

La comparaison des voltammogrammes avant et après remplacement de l'anolyte, **Figure 14**, peut permettre de distinguer les signaux appartenant aux médiateurs synthétisés par le biofilm, susceptibles d'être éliminés au moins en partie lors de l'évacuation de l'anolyte du batch.

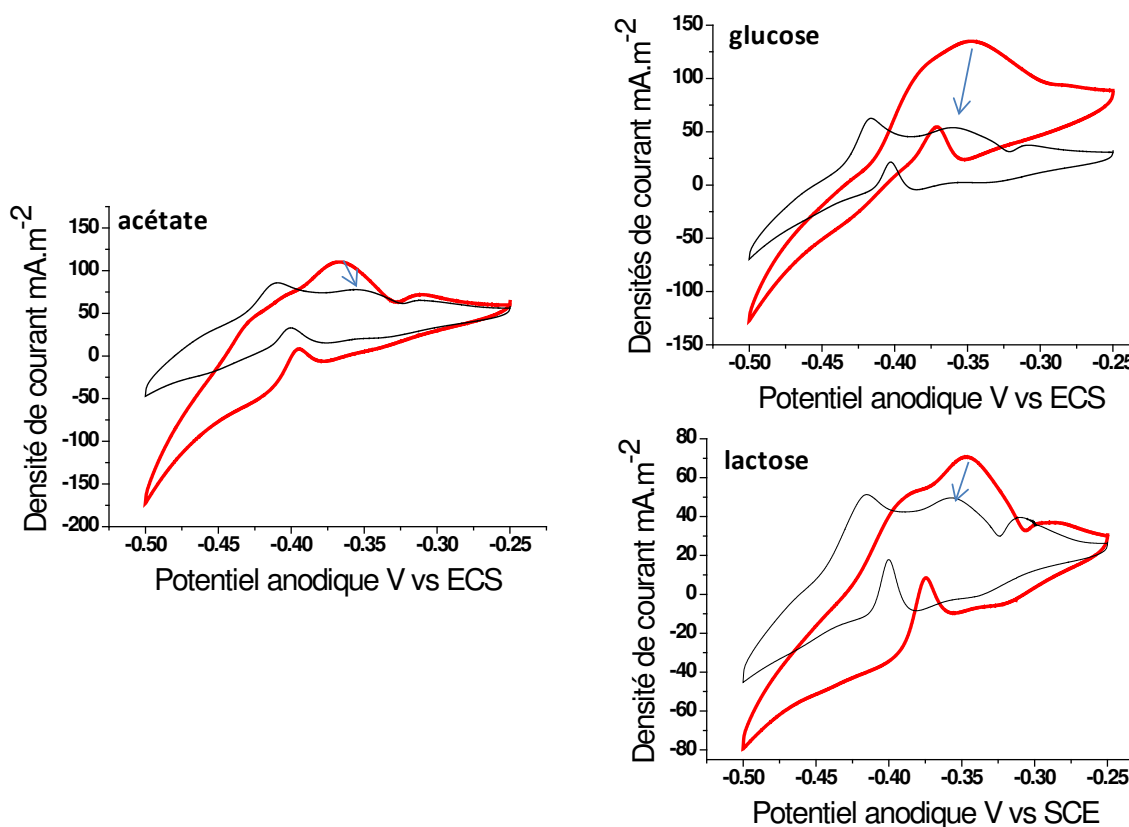


Figure 13 Comparaison des voltamogrammes enregistrés **en fin de batch** — (substrat totalement consommé) et dans un anolyte fraîchement préparé —dépourvu de substrat (pH 7.2). Les voltamogrammes ont été enregistrés sur des bioanodes jeunes (développement du biofilm avec 2 batchs d'acétate). Les mesures ont été réalisées avec les trois substrats utilisés durant l'étude. Vitesse de balayage : 1 mV.s⁻¹

On remarque que le courant du système (2) diminue fortement après remplacement de l'anolyte, ce qui suggère que ce système est un médiateur excrété dans le biofilm électroactif, qui a été en partie évacué lors du remplacement de l'anolyte. Après remplacement de l'anolyte, on observe toujours le pic du système 2. Il semble donc que ce médiateur reste en partie associé au biofilm, en particulier lorsque le lactose et le glucose ont été utilisés.

De plus, on remarque un léger décalage des potentiels redox des systèmes avant et après le remplacement de l'anolyte. Ce décalage est en partie dû à l'acidification de l'anolyte par le métabolisme bactérien. En effet, on constate une baisse de pH de 7.2 à 6.4 dans l'anolyte en fin de batch pour les substrats fermentescibles et une baisse légère de pH de 7.2 à 7 pour l'acétate. Ces baisses de pH entraînent une augmentation des potentiels redox de 48 mV et de 12 mV pour les substrats fermentescibles et l'acétate respectivement. Un tel décalage de 50 mV des potentiels a été observé après oxydation de substrats par le biofilm électroactif (Tender et al 2012). Les baisses de pH enregistrés dans l'anolyte correspondent souvent à une baisse de pH plus prononcée dans le biofilm et en particulier à l'interface entre l'anode et le biofilm. Francks

et al. (2009) montrent par exemple, une baisse de pH de 6.8 près de l'anolyte à 6.2 près de la surface de l'anode. Les modélisations de Tender et al. (2012) prédisent que ces gradients de protons sont plus prononcés lorsque le biofilms est épais. Or, le pH est un paramètre important qui contrôle l'activité métabolique des bactéries. L'activité de *Geobacter sulfurreducens* est connue pour être ralentie à des pH inférieurs à 6 (Kim et Lee 2010) et complètement inhibée à pH 5. (Patil et al. 2010). Ces observations montrent une conséquence supplémentaire de l'introduction de substrats fermentescible à l'anode : l'acidification du biofilm lors de l'oxydation de ces substrats et donc l'augmentation des potentiels des protéines redox connectant le biofilm à l'anode ce qui constitue une perte de performances de la pile.

2.3 Bilan

Cette première étude de l'adaptation des biofilms suivant les substrats fournis a permis de constater qu'il existe bien des différences de comportements entre les biofilms matures et les biofilms jeunes. Le temps de latence consécutif à l'ajout d'un nouveau substrat fermentescible est plus important lorsque le biofilm est mature que lorsque le biofilm est jeune. Une explication probable est que les bactéries fermentaires indispensables à la dégradation de composés organiques complexes sont très peu nombreuses dans les biofilms matures qui sont prédominés par les bactéries électroactives (d'après l'observation des biofilms à l'œil nu mais aussi de nombreux résultats et modèles de la littérature). Pour ces biofilms matures, le courant catalytique et les puissances délivrées sont moins élevés que pour les biofilm jeunes. Cette différence de performances sur biofilms matures a été attribuée à une chute ohmique augmentée due à l'épaisseur importante de ces biofilms. Ces résultats suggèrent que les biofilms jeunes s'adaptent mieux à divers substrats car ils possèdent une plus grande diversité d'espèces bactériennes et ils sont moins limités par la résistance au transfert de charges.

Cependant, en s'intéressant aux efficacités de la conversion des substrats, on constate que les biofilms matures sont plus efficaces que les biofilms jeunes pour oxyder des substrats complexes en générant de l'électricité. En effet, le temps de réponse après ajout de substrats complexes est légèrement plus court et le rendement faradique est meilleur sur biofilms matures que sur biofilms jeunes. Pour des performances optimisées, il semble qu'un équilibre doit s'établir entre bactéries fermentaires et bactéries électroactives afin d'améliorer la syntrophie entre ces deux communautés.

De plus, quelque soit la maturité du biofilm, les courants catalytiques et les puissances délivrées diminuent lorsque l'acétate est changé pour un substrat fermentescible. Nos données indiquent que cette baisse de performances est majoritairement attribuable à l'augmentation de la résistance ohmique dans le biofilm. Les données de la littérature suggèrent que cette augmentation de la résistance est liée au développement de bactéries non électroactives à l'anode.

Lorsqu'on compare les efficacités des biofilms dans la littérature, on se rend compte d'une grande disparité des performances observées pour l'oxydation de substrats fermentescibles. Une explication de ces disparités souvent avancée est la différence dans les modes de fonctionnement du compartiment anodique d'une publication à une autre. Par exemple, la présence ou non d'un circuit de recirculation ou encore la présence d'un mode de fonctionnement continu permet de renouveler régulièrement le milieu en contact avec le biofilm. Ce renouvellement évite l'accumulation des produits de la métabolisation du substrat au sein de la bioanode. D'un autre côté, nous avons observé par voltamétrie cyclique que ce renouvellement de l'anolyte pouvait entraîner l'élimination d'intermédiaires tels que des molécules redox fortement impliqués dans la génération d'électricité. On peut aussi imaginer que le renouvellement de l'anolyte a des conséquences sur les communautés bactériennes présentes, notamment sur les bactéries fermentaires et les microorganismes méthanogènes qui ne sont pas forcément associées fortement au biofilm et peuvent se développer en suspension dans l'anolyte. Dans la deuxième étude discutée ci-après en partie 3, nous avons étudié pour un même design de pile et un même inoculum, l'influence d'un renouvellement régulier de l'anolyte sur les performances des biofilms anodiques jeunes.

3 Etude de l'adaptation de biofilms anodiques face à des changements de substrats avec ou sans renouvellement de l'anolyte

Dans cette étude, la configuration et la mise en place des piles ont été identiques à celles précédemment utilisées : nous avons choisi d'utiliser pour ces travaux des biofilms jeunes, c'est-à-dire pour lesquels la phase de développement initiale est effectuée sur deux batchs successifs d'acétate. Ainsi, en parallèle des travaux présentés précédemment dans ce chapitre, nous avons étudié des piles pour lesquelles les ajouts des différents substrats ont été réalisés sans remplacement de l'anolyte. Les performances de ces piles ont été comparées aux piles à biofilms jeunes des travaux précédents pour lesquelles chaque ajout s'accompagne d'un renouvellement

complet de l'anolyte. L'influence du renouvellement régulier de l'anolyte a été étudiée pour deux substrats : le glucose et l'acétate et les paramètres étudiés ont été : les temps de latence, l'efficacité faradique, les courbes de polarisation et les courants catalytiques à l'anode.

3.1 Temps de latence consécutif à un changement de substrat

Pour deux bioanodes étudiées, les biofilms électroactifs se développent au cours de deux batchs successifs d'acétate (0.1 g COT/L) avec renouvellement complet de l'anolyte. Pour les deux autres piles, les biofilms se développent avec deux ajouts d'acétate successifs sur le même anolyte de départ. Une fois que les bioanodes sont fonctionnelles, le substrat fourni est changé pour le glucose (0.1 g COT/L, soit 1.3 mM). Comme nous l'avons constaté dans la partie 2, après ajout d'acétate (substrat adapté au métabolisme des bactéries électroactives telles que *G. sulfurreducens*), le courant délivré augmente quasiment immédiatement, ce qui donne un temps de réponse des systèmes de quelques heures. Lorsque le substrat est changé pour un substrat fermentescible, ce temps est allongé car la dégradation de ces substrats requiert des espèces bactériennes fermentaires, qui mettent plusieurs heures à plusieurs jours à se développer. Ici, nous cherchons à voir si le renouvellement de l'ensemble de l'anolyte a une influence sur ce temps de réponse lors d'un changement de substrat. Les temps de latence mesurés sont reportés dans le **Tableau 7** ci-dessous.

Temps de latence lié au premier ajout de glucose	
Anolyte renouvelé *	17.5 ± 5 h
Anolyte non renouvelé	60 ± 1h

Tableau 7 Temps de latence constatés après premier changement pour un substrat fermentescible. Les expériences sont réalisées sur des biofilms jeunes (développement en 2 batchs/ajouts d'acétate successifs). Chaque expérience est réalisée en duplicat. Les temps de latence reportés ici sont des moyennes calculées pour 2 piles d'une même expérience. *cf. **Tableau 1** 1^e ligne, 1^e colonne.

On constate ici que le renouvellement de l'anolyte a une forte influence sur le temps de réponse des biofilms lors du passage à un substrat fermentescible. On pourrait penser que le non renouvellement de l'anolyte permet de garder une grande diversité de bactéries en suspension dans l'anolyte et ainsi faciliter l'adaptation rapide à un substrat nouveau et fermentescible. On constate cependant que le non renouvellement de l'anolyte entraîne un allongement important des temps de latence consécutifs à un changement de substrat. Pour les piles sans renouvellement, les ajouts successifs d'acétate et leur oxydation par les bioanodes ont

pour conséquence une accumulation de protons dans le biofilm. En effet, dans les piles sans renouvellement d'acétate, on observe une diminution du pH dans l'anolyte de 7.2 à 6.8. Or, cette accumulation de protons peut favoriser le développement des microorganismes méthanogènes acétoclastes et a des conséquences néfastes sur la génération d'électricité par le biofilm. Le développement des méthanogènes est moins favorisé dans les systèmes où l'anolyte est renouvelé car ces microorganismes se développent lentement et sont majoritairement évacués avec l'anolyte. De plus, lorsque l'anolyte n'est pas renouvelé, l'accumulation de protons acidifie le biofilm à des pH inférieurs à ceux mesurés dans l'anolyte, ce qui peut ralentir le métabolisme des bactéries électroactives (voir discussion du paragraphe 2.2.4). Le ralentissement du métabolisme des bactéries électroactives et la présence favorisée de méthanogènes expliquerait que les biofilms anodiques mettent plus de temps à s'adapter à un nouveau substrat lorsque l'anolyte n'est pas remplacé.

3.2 Rapidité des biofilms à dégrader le substrat (acétate et glucose) après acclimatation au substrat

A la suite du premier ajout de glucose, les différentes communautés de bactéries nécessaires à l'oxydation des substrats fermentescibles se développent et s'établissent à l'anode : les bactéries fermentaires sont en nombre suffisant pour dégrader rapidement le glucose en acides gras volatils qui sont par la suite oxydés par les bactéries électroactives en générant de l'électricité. Lors du second ajout du même substrat, nous avons constaté dans notre première étude (partie 2) que les temps de réponse des bioanodes sont alors plus courts car l'arrivée du substrat ne fait que réactiver les métabolismes des bactéries fermentaires et des bactéries électroactives. Nous nous sommes demandé si le renouvellement ou non de l'anolyte influence ce temps de réponse des bioanodes pour les deux substrats testés, l'acétate non fermentescible et le glucose fermentescible. Les mesures sont réunies dans le **Tableau 8** ci-dessous.

Temps de latence des biofilms acclimatés au substrat		
	Acétate → acétate	Glucose → glucose
Anolyte renouvelé	2.1 ± 0.8 h	7 ± 2 h
Anolyte non renouvelé	4 ± 2 h	7 ± 1 h

Tableau 8 Temps de latence mesurés lorsque les communautés bactériennes nécessaires à l'oxydation des substrats sont déjà développées. Les expériences sont réalisées sur des biofilms jeunes (développement initial en 2 batches/ajouts d'acétate successifs). Chaque expérience est réalisée en duplicat. Les temps de latence reportés ici sont des moyennes calculées pour 2 piles d'une même expérience. L'acétate et le glucose sont ajoutés de sorte d'avoir des concentrations en COT identiques, soit 0.1 g COT/L.

Lorsque les communautés microbiennes de l'anode sont habituées à un même substrat, les résultats sur les temps de latence sont moins évidents à comprendre. Avec l'acétate non fermentescible, le temps de latence est plus court lorsque l'anolyte n'est pas renouvelé ce que nous avons attribué à l'accumulation néfaste de protons au sein du biofilm. En effet, l'oxydation de l'acétate fourni dans un batch entraine la diminution d'un pH de 7.2 à un pH de 7. Pour une concentration équivalente de COT, l'oxydation du glucose fourni dans un batch entraine une baisse de pH encore plus important : on passe d'un pH de 7.2 à un pH de 6.4. Or, les temps de latence sont les mêmes que l'anolyte soit renouvelé ou pas. Une explication possible serait que lorsque l'anolyte n'est pas remplacé, les médiateurs sécrétés nécessaires à la génération d'électricité ne sont pas éliminés (Rabaey et al. 2004). Leur présence en concentration élevée au sein du biofilm, permet une réponse rapide du biofilm (Logan et Regan 2006, Rabaey et al. 2004) et contrebalancerait l'effet de l'accumulation de protons. Cette forte concentration en médiateurs redox peut être vérifiée par voltamétrie cyclique lorsque le substrat a été totalement consommé à l'anode (voir **Figure 14** ci-dessous).

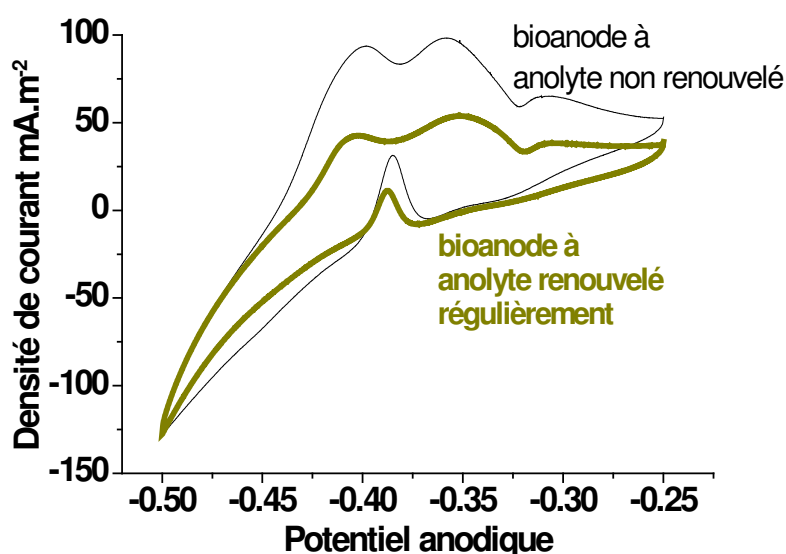


Figure 14 Voltamogramme réalisés sur des biofilms jeunes (développement initial par 2 batchs successifs d'acétate) en absence de substrat (glucose totalement consommé) dans un anolyte renouvelé à chaque batch et dans un anolyte non renouvelé depuis 2 batchs.

Lorsque l'anolyte n'est pas renouvelé, on observe que les courants faradiques des molécules redox sont globalement supérieurs au courants des molécules enregistrés à l'anode où le milieu est totalement changé à chaque batch. Ces résultats indiquent que lorsque l'anolyte n'est pas renouvelé, la quantité de molécules redox connectant le biofilm à l'anode est plus importante que lorsque l'anolyte est renouvelé.

3.3 Efficacité faradique des biofilms anodiques sous acétate et sous glucose

Une fois que les communautés bactériennes nécessaires à l'oxydation des substrats utilisés sont établies, on peut caractériser leurs performances en évaluant la part de substrat participant effectivement à la génération du courant par le calcul du rendement faradique pour un batch / un ajout de substrat. Les rendements faradiques en présence et en absence de renouvellement de l'anolyte sont présentés ci-après, dans le **Tableau 9**.

Efficacités faradiques calculées pour les différents substrats étudiés		
	Acétate	Glucose
Anolyte renouvelé	11 ± 1 %	12 ± 1 %
Anolyte non renouvelé	10 ± 3%	7 ± 2 %

Tableau 9 Efficacités faradiques mesurées lorsque les communautés bactériennes nécessaires à l'oxydation des substrats sont déjà développées. Les expériences sont réalisées sur des biofilms jeunes (développement initial en 2 batches/ajouts d'acétate successifs). Chaque expérience est réalisée en duplicat. Les efficacités faradiques reportées ici sont des moyennes calculées pour 2 piles d'une même expérience. L'acétate et le glucose sont ajoutés de sorte d'avoir des concentrations en COT identiques, soit 0.1 g COT/L.

L'efficacité faradique de l'oxydation de l'acétate lorsque l'anolyte est renouvelée est équivalente à celle mesurée lorsque l'anolyte n'est pas renouvelé. En revanche, avec le glucose, le non renouvellement de l'anolyte entraîne une forte baisse de l'efficacité faradique. Cette baisse d'efficacité faradique est concomitante à deux phénomènes observés lorsque l'anolyte n'est pas renouvelé : une baisse de pH et une prolifération de bactéries en suspension. Le pH de l'anolyte après le deuxième ajout de glucose a diminué à un pH de 6.3. Cette baisse de pH est suffisante pour ralentir le métabolisme des bactéries électroactives à l'anode (Kim et Lee, 2010). Il est probable que ce ralentissement du métabolisme des bactéries électroactives associé à la présence de méthanogènes dans l'anolyte entraîne la baisse importante des efficacités faradiques de l'oxydation du glucose lorsque l'anolyte n'est pas renouvelé. On constate en effet, une prolifération de bactéries en suspension dans les piles dont l'anolyte n'est pas remplacé. Ces bactéries en suspension peuvent être soit des bactéries fermentaires participant au moins en partie à la génération d'électricité soit des microorganismes méthanogènes entraînant une baisse de l'efficacité faradique du système. Dans nos systèmes, on peut noter que le renouvellement de l'anolyte permet en principe d'éliminer en partie les bactéries méthanogènes de façon mécanique mais aussi grâce à une exposition de quelques minutes du biofilm à l'oxygène. En effet, il a été démontré (Freguia et al. 2008) que l'aération des biofilms pouvait inhiber voire détruire les bactéries méthanogènes.

Une expérience complémentaire a été réalisée sur une des piles dont l'anolyte n'avait pas été renouvelée depuis le début de l'expérience. Pour une de ces piles, l'anolyte a été remplacé entièrement avec 0.1 g COT/L de glucose. Dans ce cas, on constate que l'efficacité faradique atteint 12 %, montrant que les baisses d'efficacité faradiques ne sont pas irréversibles. De plus, cette observation démontre bien l'intérêt d'un renouvellement régulier de l'anolyte sur les performances des bioanodes, en particulier lorsque le substrat fourni est fermentescible.

3.4 Performances électriques et limitations des biofilms anodiques catalysant l'oxydation de l'acétate ou du glucose

Les performances des piles fonctionnant avec et sans renouvellement de l'anolyte ont été évaluées par mesure de polarisation et les résultats sont résumés dans le **Tableau 10** suivant.

Puissance et limites des piles à biofilms jeunes suivant les différents substrats étudiés		
Anolyte renouvelé		
	Acétate	Glucose
Puissance maximale moyenne	$132 \pm 21 \text{ mW.m}^{-2}$	$91 \pm 8 \text{ mW.m}^{-2}$
Résistance interne	$348 \pm 22 \Omega$	$443 \pm 16 \Omega$
Limites remarquables	–	–
Anolyte non renouvelé		
	Acétate	Glucose
Puissance maximale moyenne	$102 \pm 28 \text{ mW.m}^{-2}$	$57 \pm 28 \text{ mW.m}^{-2}$
Résistance interne	$549 \pm 280 \Omega$	$830 \pm 300 \Omega$
Limites remarquables	–	Transport de masse

Tableau 10 Performances des piles évaluées par mesure de polarisation et puissance. Trois paramètres sont pris en compte : la puissance maximale délivrée, la résistance interne (pente de la partie linéaire de la courbe de polarisation, présence de chutes de potentiel importantes aux faibles courants (surtension) ou présence de chutes de potentiel importants (limites liées à la diffusion du substrat, remarque : l'anolyte n'est pas agité). Les expériences sont réalisées sur des biofilms jeunes (développement initial en 2 batchs/ajouts d'acétate successifs). Chaque expérience est réalisée en duplicat. Les efficacités faradiques reportées ici sont des moyennes calculées pour 2 piles d'une même expérience. L'acétate et le glucose sont ajoutés afin d'obtenir des concentrations en COT identiques, soit 0.5 g COT/L.

De même que pour l'efficacité faradique, lorsque l'anolyte n'est pas remplacé, les puissances maximales délivrées sont globalement diminuées. Pour l'acétate, la puissance maximale

moyenne diminue légèrement lorsque l'anolyte n'est pas remplacé mais cette diminution n'est pas significative. En revanche, avec le glucose, le non renouvellement de l'anolyte entraîne une forte baisse de la puissance maximale par rapport à celle qui est atteinte lorsque l'anolyte est remplacé. Plusieurs causes de ces baisses ont déjà été identifiées précédemment.

Augmentation de la résistance interne

Tout d'abord, on constate que les pertes d'efficacité sont à relier avec l'augmentation de la résistance interne des piles, qui est particulièrement importante lorsque l'anolyte n'est pas renouvelé. Plusieurs facteurs peuvent expliquer l'augmentation de la résistance interne.

Nous avons par exemple évoqué le colmatage de la membrane échangeuse de proton. Ce colmatage est lié au développement de bactéries sur la face anodique de la membrane (Kim et al. 2006). Ce phénomène peut entraver le passage des ions et ainsi augmenter la résistance totale de la pile. Ces bactéries peuvent en plus détourner le substrat sans participer à la génération d'électricité. Une expérience complémentaire a donc été effectuée sur une des piles dont l'anolyte n'avait pas été renouvelé depuis le début de l'expérience. Avant le remplacement de l'anolyte, la puissance maximale délivrée par la pile pour l'oxydation du glucose est de 48 mW.m⁻². Après remplacement de l'anolyte, la puissance maximale délivrée par le biofilm oxydant le glucose augmente à 79 mW.m⁻². L'amélioration des puissances constatées après renouvellement de l'anolyte peut être due au réajustement à pH proche de 7 favorable aux bactéries et/ou à l'élimination des bactéries en suspension. La puissance maximale a bien augmenté après renouvellement de l'anolyte mais elle est encore inférieure à ce qui est observé dans les piles pour lesquelles l'anolyte est renouvelé à chaque ajout de substrat. Il est possible que cette valeur toujours relativement faible de la puissance délivrée après renouvellement de l'anolyte soit due à la présence de bactéries sur la membrane échangeuse de protons. En transférant la bioanode étudiée dans une pile refaite complètement, avec une membrane neuve, nous avons mesuré une puissance maximale délivrée de 93 mW.m⁻², équivalente à celles mesurées dans des piles pour lesquelles l'anolyte a été renouvelé régulièrement. Ces observations démontrent que la diminution des puissances maximales délivrées et de l'efficacité faradique des biofilms provient bien à la fois de l'accumulation des produits métaboliques et à la diminution du transport des ions entre les compartiments anodiques et les compartiments cathodiques. Cette diminution du transport des ions à travers la membrane est concomitante avec la prolifération de bactéries en suspension dans l'anolyte, ce qui suggère que la diminution des performances de la membrane est due à son colmatage par les bactéries. L'aspect gluant de la membrane retirée, typique de la formation d'exopolymère par un biofilm bactérien, vient de

plus confirmer cette hypothèse du colmatage de la membrane. Cependant, lors de l'observation des membranes gluantes par Microscopie Electronique à Balayage, la présence d'un biofilm n'a pas été confirmée.

Nous avons observé que la résistance interne des piles augmente suite à l'introduction de substrats fermentescibles. Cette augmentation a été attribuée à un épaissement du biofilm due au développement de couches supplémentaires de bactéries non électroactives. Ces couches supplémentaires de bactéries peuvent entraîner une baisse de la conductivité des biofilms mais aussi une baisse de la diffusion des substrats dans le biofilm (voir discussion du paragraphe 2.2.3). Cette limite de diffusion des piles sans renouvellement d'anolyte et en présence de glucose, qui sont deux conditions favorables à la prolifération de bactéries non électroactives. Cette hypothèse est aussi étayée par la dégradation dans le temps des performances observées pour les piles à anolyte non renouvelé. On observe en effet que les performances de ces piles diminuent au fil des ajouts de glucose, d'où la grande dispersion des résultats autour de la moyenne. Le non renouvellement de l'anolyte entraîne de plus une acidification de l'anolyte et du biofilm qui peut aussi entraîner un ralentissement du métabolisme des bactéries électroactives et expliquer les baisses de performances à l'anode.

3.5 Courants catalytiques de l'oxydation de l'acétate ou du glucose par les biofilms anodiques

L'effet négatif du non renouvellement de l'anolyte s'observe aussi lorsqu'on étudie les courants catalytiques liés à l'oxydation des substrats par les biofilms (**Tableau 11**, ci-dessous)

Densités de courant catalytiques selon les différents substrats étudiés		
	Acétate	Glucose
Anolyte renouvelé	$1.22 \pm 0.2 \text{ A.m}^{-2}$	$0.67 \pm 0.2 \text{ A.m}^{-2}$
Anolyte non renouvelé	$0.20 \pm 0.01 \text{ A.m}^{-2}$	$0.13 \pm 0.03 \text{ A.m}^{-2}$

Tableau 11 Densités de courants catalytiques due à l'oxydation du substrat à l'anode, mesurés par voltamétrie cyclique à vitesse de balayage lente 1 mV.s^{-1} . Les voltamétries cycliques sont réalisées en présence d'une concentration non limitante de substrat, soit 0.5 g COT/L . La valeur du courant catalytique est prise sur le plateau de courant observé sur les voltamogrammes. Toutes les valeurs sont relevées sont celles prises à 0 V vs ECS . Les valeurs reportées sont des moyennes calculées sur les mesures de 2 piles identiques.

On constate que pour les deux substrats testés ici, le non renouvellement de l'anolyte entraîne une diminution des courants catalytiques de 5 à 6 fois par rapport à ce que les biofilms peuvent délivrer lorsque l'anolyte est remplacé. De plus, lorsque l'anolyte n'a pas été remplacé

les voltamogrammes montrent un ralentissement de l'oxydation du substrat, en particulier pour l'oxydation du glucose et un pseudo-plateau catalytique, équivalent à ce qui avait été observé pour les biofilms matures dans l'étude décrite en partie 2 de ce Chapitre. Ce ralentissement a été attribué à la fois à une baisse de la conductivité du biofilm lié au développement de bactéries non électroactives à l'anode mais aussi d'une acidification du biofilm susceptible de ralentir le métabolisme des bactéries électroactives.

3.6 Bilan

Nous avons montré que le renouvellement régulier de l'anolyte était préférable pour obtenir de meilleures performances dans la conversion de la matière organique en électricité. D'une part, ce renouvellement éviterait l'accumulation de produits du métabolisme, en particulier des protons qui abaissent le pH à des valeurs proches de pH 6 et inhibe le métabolisme des bactéries impliquées dans la production de courant. D'autre part, le renouvellement de l'anolyte empêche la prolifération excessive de bactéries dans l'anolyte. Cette prolifération de bactéries peut avoir des effets négatifs sur les performances des bactéries car i) il peut s'agir de bactéries détournant le substrat sans participer à la génération de courant électrique comme les bactéries méthanogènes ou ii) il peut s'agir de bactéries utilisant le dioxygène dissous pour consommer les substrats fournis à l'anode ; il semble que ce dernier type de bactéries abaisse non seulement l'efficacité faradique en détournant le substrat de la génération d'électricité mais il pourrait également entraver le transport des ions en colonisant les membranes des piles ; enfin iii) cette prolifération peut aussi épaissir le biofilm ainsi abaisser sa conductivité et donc les cinétiques de la catalyse d'oxydation à l'anode.

Conclusion du Chapitre 2

Les travaux présentés dans ce chapitre permettent de montrer que l'efficacité et de la conversion des eaux usées en électricité dépend de facteurs multiples tels que la nature des déchets organiques à convertir, la composition microbienne dans le biofilm et dans l'anolyte ou encore le mode de fonctionnement de l'anode.

Les biofilms électroactifs semblent particulièrement adaptés à la génération d'électricité à partir de produits de fermentation tels que les acides gras volatils. Nous avons utilisé une méthode éprouvée pour enrichir des biofilms en bactéries électroactives, que nous avons désignés comme biofilms matures. La couleur de telles bioanodes et de leurs anolyte est la caractéristique de bioanodes développées à partir de cultures pures de *G. sulfurreducens*, ce qui laisse penser que des bactéries électroactives de type *Geobacter* sont majoritaires dans ces anodes matures. Nous avons observé que pour ces biofilms riches en bactéries électroactives, la conversion de l'acétate en électricité est efficace. En revanche, lorsque les substrats sont changés pour des substrats fermentescibles, la conversion se fait en plusieurs étapes impliquant différentes communautés microbiennes. En effet, les bactéries électroactives doivent s'associer à des bactéries fermentaires capables de convertir les substrats fermentescibles en acides gras volatils. Pour l'oxydation de substrats fermentescibles, la diversité des espèces microbiennes de biofilms plus jeunes est un atout ce qui permet de réduire le temps d'adaptation au substrat fermentescible et d'augmenter l'efficacité de la conversion.

Nous avons constaté aussi que les performances liées à la conversion des substrats en électricité diminuent lorsque le substrat est fermentescible et lorsque le biofilm est mature. En effet, l'utilisation de substrats fermentescibles à l'anode pose aussi le problème de la croissance excessive de microorganismes non électroactifs. Ces bactéries peuvent être des bactéries fermentaires et participer à la génération de courant. Cependant, ces espèces ne forment pas forcément de biofilms conducteurs. Nos résultats tendent à montrer que ces bactéries diminuent la conductivité des biofilms, en particulier lorsque le biofilm est déjà épais. Cette baisse de conductivité diminuerait ainsi les courants catalytiques délivrés par les biofilms, ce qui posera certainement des problèmes d'efficacité d'épuration si on envisage le traitement d'eaux usées brutes par les piles à combustibles microbiologiques. La présence de substrats fermentescibles peut aussi entraîner le développement excessif de microorganismes détournant le substrat fourni sans générer d'électricité. Ces microorganismes sont de type méthanogène ou

ce sont des bactéries métabolisant les substrats en utilisant le dioxygène infiltré à l'anode. Ce problème de détournement de substrats pourrait se poser en particulier avec des systèmes de piles sans flux ou avec un flux d'anolyte renouvelé lentement. En effet, nous avons montré que le non renouvellement régulier de l'anolyte pouvait entraîner une prolifération néfaste des bactéries non impliquées dans la génération d'électricité. Cette prolifération entraîne non seulement une baisse de l'efficacité faradique mais aussi une baisse des performances électrique par colmatage de la membrane échangeuse de cations séparant anode et cathode.

Les résultats de cette étude centrée sur la technologie des piles à combustible en tant que procédés de traitement des eaux usées couplée à la production d'électricité posent la question de l'évolution des performances et de l'efficacité de biofilms électroactifs. Dans un milieu comme les eaux usées brutes où les communautés bactériennes ne sont pas figées et contrôlées, les anodes microbiennes sont susceptibles d'être envahies par des communautés microbiennes non électroactives consommant les polluants plus rapidement que le biofilm exoélectrogène, rendant la technologie des piles microbienne moins efficace. Des solutions peuvent être envisagées.

Une première serait d'adapter les eaux usées à traiter afin d'installer une pression de sélection favorable aux bactéries électroactives anodiques et éviter ainsi la prolifération d'espèces microbiennes indésirables. Une utilisation optimale des bioanodes pour le traitement de pollutions serait d'envisager une pré-étape de fermentation de la pollution organique en acides gras volatils, soit en stations d'épuration, soit en fermentateurs anaérobies. Les acides gras volatils issus de ce premier traitement seraient en suite oxydés en CO_2 par les biofilms électroactifs et permettraient de produire de l'électricité. Avec ce type de substrat, le fonctionnement du biofilm électroactif est optimal et les risques de prolifération de bactéries méthanogènes sont moins importants. Une autre utilisation optimale pourrait être de sélectionner des eaux polluées riches en acétate, par exemple des effluents d'industries de fermentation alcoolique, comme les producteurs industriels de bioéthanol.

Une autre solution serait d'améliorer le fonctionnement du biofilm électroactif en termes de consommation de substrat et donc de génération d'électricité. Améliorer le fonctionnement du biofilm électroactif permet de lui conférer un plus grand avantage compétitif sur les autres espèces microbiennes. Un moyen reconnu pour augmenter les performances de la respiration

anodique est de concevoir une surface d'électrode favorisant une connexion efficace des bactéries électroactives. Il s'agit du second thème traité dans ces travaux de thèse et fait l'objet des chapitres suivants. Le Chapitre 3 qui suit est consacré à une étude dont j'ai eu l'initiative sur une modification originale de surface d'anodes visant à améliorer le fonctionnement des biofilms électroactifs.

Section expérimentale

Description des piles à combustible microbienne utilisées

Les expériences décrites dans ce Chapitre 2 sont menées sur des piles de type H. Ces piles sont constituées de deux compartiments cylindriques d'un volume de travail de 300 mL.

Les compartiments anodique et cathodique sont liés à mi-hauteur par une membrane échangeuse de cations de 3.8 cm^2 (*Fumasep FTCM-E, Fumatech, Allemagne*). Les électrodes utilisées sont en carbone graphite (*Einsenhuth GmbH & co*) d'une trentaine de centimètres carrés. Avant leur utilisation dans la pile, les électrodes sont poncées avec du papier de verre (22 μm , *Struers*) et subissent un court nettoyage au bain à ultra-sons.

A la cathode, l'accepteur d'électrons employé est le ferricyanure de potassium $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (0.1 M dans 20 mM de tampon phosphate à pH 7). Une telle concentration de ferricyanure permet d'obtenir un potentiel cathodique stable.

Le compartiment anodique est un bioréacteur inoculé à partir d'eaux usées (station d'épuration de Beaurade, Rennes). Le milieu de culture est constitué de tampon phosphate (20mM) pH 7, d'une solution de 10 mL/L de macronutriments (28 g/L NH_4Cl , 10 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et 0.57 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), d'une solution de 1 mL/L de micronutriment (2 g/L $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/L $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g/L ZnCl_2 , 0.05 g/L H_3BO_3 , 0.04 g/L $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.07 g/L $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{22} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.16 /L $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ and 2 mL/L HCl 37%) et de solution de vitamines (1 mL/L). Lors de l'établissement du biofilm, le substrat principal utilisé est l'acétate de potassium. Par la suite, le substrat a été changé pour du glucose ou du lactose, à des concentrations choisies telles que le carbone organique total (COT) ajoutée soit de 0.1 mg de COT /L. Les piles fonctionnent à température ambiante et en mode batch, avec une résistance externe de 1 K Ω . Le schéma suivant illustre le dispositif.

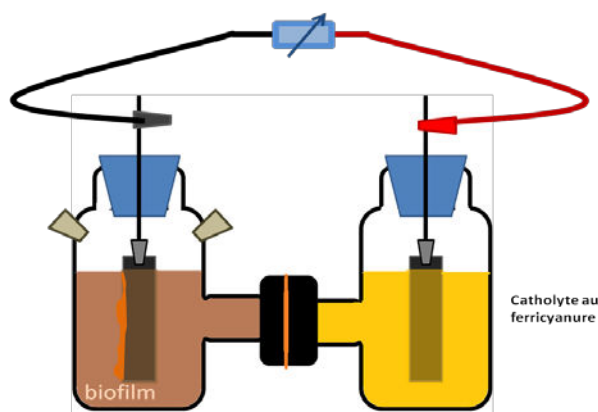
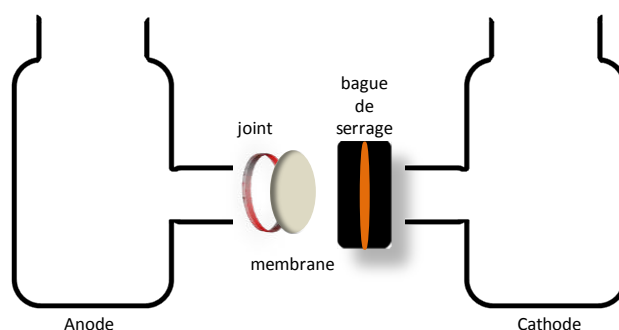


Figure 15 Schéma du dispositif utilisé pour l'étude des bioanodes

Construction du dispositif

Les compartiments anodique et cathodique sont tout d'abord assemblés comme indiqué sur le schéma suivant grâce à l'utilisation d'une bague de serrage qui permet aussi la tenue de la membrane séparant les compartiments.



Dans un second temps, on prépare les électrodes, l'anode et la cathode qui sont des plaques de graphite mesurant entre 20 et 30 cm² (Einsenhut GmbH & Co). Avant utilisation, les électrodes sont polies à l'aide d'un papier abrasif (taille de grain : 22 µm, Struers) et mesurées afin de pouvoir rapporter les mesures de puissance maximale et de courant catalytique à la surface d'électrode colonisable par le biofilm électroactif. Les électrodes sont connectées au circuit externe à l'aide de pinces crocodiles que l'on protège de l'anolyte avec des rubans de plomberie. A l'anode, la pince crocodile est enfoncée dans un bouchon hermétique afin d'empêcher l'oxygène de pénétrer dans le compartiment. Les compartiments sont remplis de leur électrolyte respectifs. Afin d'évacuer le dioxygène de l'anolyte, on fait buller de l'argon dans le compartiment anodique durant 15 minutes. Le circuit est alors connecté à une résistance de 1 kΩ.

Le développement du biofilm sur l'anode est suivi par prise de la différence de potentiel à l'aide d'un multimètre (Velleman DVM9912 multimeter) toutes les heures. Lorsque la différence de potentiel chute à moins de 40 mV, un nouveau batch d'anolyte est réalisé. L'anolyte est éliminé et remplacé par une solution fraîchement préparée sans substrat. De l'argon est injecté pendant 15 minutes. L'ajout de substrat se fait quelques heures plus tard, lorsque la différence de potentiel est stabilisée à une valeur inférieure à 40 mV.

Lorsque la différence de potentiel de la pile en fonctionnement stationnaire est stable, on caractérise ses performances.

Mesure d'efficacité faradique

Cette mesure permet de calculer la part de substrat réellement transformée en électricité dans la pile. L'expérience débute en absence de substrat. Après l'ajout du substrat, la différence de potentiel des piles est suivi en régulièrement jusqu'à son entière consommation par les bactéries du réacteur. La charge fournie est calculée à partir de l'équation d'oxydation du substrat utilisé

- Acétate : $\text{CH}_3\text{COOH} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{CO}_2 + 8 \text{H}^+ + 8\text{e}^-$
- Glucose : $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 6 \text{CO}_2 + 24 \text{H}^+ + 24\text{e}^-$
- Lactose : $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} + 13 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 12 \text{CO}_2 + 48 \text{H}^+ + 48 \text{e}^-$

$$Q_{\text{fournie}} = n_{\text{substrat}} \times \text{nombre d'électrons échangés dans la réaction} \times \mathcal{F}$$

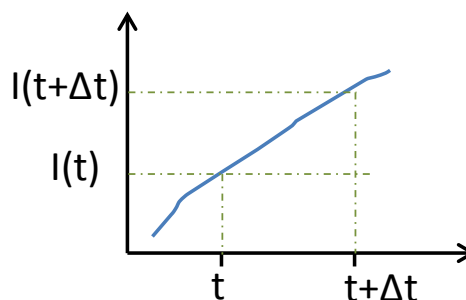
Le calcul donne 754 C fournis lorsque l'acétate est ajouté (4 mM), 770 C pour le glucose (13mM) et 812 pour le lactose (7 mM).

On trace le courant généré en Ampère (différence de potentiel divisé par la résistance) en fonction du temps en seconde. La charge qui est récupérée sous forme d'électricité se calcule en intégrant le courant généré consécutivement à l'ajout de substrat par le temps que dure le batch.

$$Q_{\text{récupéré}} = \int I dt$$

Cette intégration se fait sur tableur, en calculant l'aire sous la courbe. On calcule pour chaque intervalle de temps l'aire sous la courbe par la formule ci dessous

$$\Delta t \times I(t) + \Delta t \times 0,5 \times (I(t+\Delta t) - I(t))$$



On calcule alors la somme de l'ensemble des aires et on y retire l'aire du courant résiduel ($I_{\text{résiduel}} \times \text{durée du batch}$)

Mesure de Carbone organique Total (COT)

Les mesures de concentrations en Carbonique Organique Total (**Figure 6**) sont réalisées par un analyseur de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes (Shimadzu TOC-VCPH). Ces concentrations ont été mesurées sur des échantillons d'anolyte, dilué au 10^6 dans de l'eau ultra-pure et conservés à 4°C avant l'analyse. L'échantillon est d'abord acidifié et du diazote est bullé afin d'éliminer le carbone inorganique (CO_2 , HCO_3^-) contenu dans l'échantillon. Les composés carbonés organiques de l'échantillon sont transformés en dioxyde de carbone par combustion catalytique à 680°C. Le CO_2 formé est alors analysé par un détecteur infrarouge.

Mesure de polarisation

Les courbes de polarisation ont été effectuées en utilisant un potentiostat en mode chronoampérométrie. La chronoampérométrie consiste à imposer un potentiel constant à l'électrode de travail. Le potentiostat mesure au cours du temps le courant résultant des réactions électrochimiques qui se produisent à la surface de l'électrode de travail. Dans le cas des courbes de polarisation réalisée sur la pile, on cherche à imposer une différence de potentiel entre l'anode et la cathode. L'anode est connectée par les fils de la contre électrode et de la référence tandis que la cathode est connectée comme électrode de travail. En début de mesure, la pile est à circuit ouvert. La différence de potentiel à circuit ouvert (OCV) correspond à la différence de potentiel maximum appliquée durant la chronoampérométrie. Cette différence de potentiel est appliquée durant 300 secondes, ce qui est suffisant pour mesurer un courant stable délivré par la pile. On diminue alors progressivement la différence de potentiel de 0,1 OCV à chaque étape. Finalement, on obtient des mesures pour 10 paliers de potentiels. A chaque

palier, il est possible de mesurer le potentiel de l'anode ou de la cathode en introduisant une électrode de référence dans les compartiments.

Etude de l'électroactivité de biofilms

On peut étudier l'électroactivité des biofilms par voltamétrie cyclique. La voltamétrie cyclique consiste à appliquer à un système, ici la bioanode, un potentiel variant de façon linéaire entre une valeur initiale et une valeur limite puis de cette valeur limite à la valeur initiale. On mesure la réponse du système sous forme du courant délivré.

Cette mesure se réalise à l'aide d'un montage à trois électrodes. Un potentiel est appliqué à l'électrode de travail par rapport à l'électrode de référence. Le courant résultant des réactions se produisant à l'électrode de travail circule entre l'électrode de travail et la contre électrode, sans passer par l'électrode de référence donc sans perturber cette référence.

Dans nos mesures sur biofilm électroactif, l'électrode de travail est l'anode, la contre électrode est la cathode. L'électrode de référence est une électrode au calomel saturé et est introduite dans le compartiment anodique sous flux d'argon afin d'éviter l'intrusion de dioxygène. La vitesse variation de potentiel, appelée vitesse de balayage peut être choisie. Afin d'observer l'électroactivité de biofilms bactériens, on choisit une vitesse de balayage faible, pour nos études 1 mV.s^{-1} .

Deux types de voltamogramme ont été enregistrés : en présence et en absence de substrat. En présence de substrat, on observe la catalyse de l'oxydation du substrat par les biofilms. En absence de substrat, on observe les signaux des molécules électroactives permettant la connexion des bactéries électroactives à l'électrode. En absence de substrat, un premier voltamogramme est enregistré dans l'anolyte en fin de batch. Puis l'anolyte est remplacé par un anolyte frais pour le batch suivant et un second voltamogramme est enregistré.

Références du Chapitre 2

A

Bullen R. A., Arnot T. C., Lakeman J. B., Walsh F.C.
Biosensors and Bioelectronics **21**, 2006, 2015-2045
"Biofuel Cells and their development"

P. Aelterman, K. Rabaey, P. Clauwaert, W. Verstraete
Water Science Technology **54**, 2006, 9-15
"Microbial fuel cells for wastewater treatment"

B

Babauta J. T., Nguyen H. D., Harrington T. D., Renslow R., Beyenal H.
Biotechnology and Bioengineering **10**, 2012, 2651-2662
"pH, redox potential and local biofilm potential microenvironments within *Geobacter sulfurreducens* biofilms and their roles in electrons transfer"

Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L.
Biochemistry, **5th edition**, 2001, Wiley H. Freeman and Company, New York,

Borole A. P., Reguera G., Ringeisen B., Wang Z. W., Feng Y., Kim B. H.
Energy and Environmental Science **4**, 2011, 4813-4834
"Electroactive biofilms: Current status and future research needs"

C

Chaudhuri S. K., Lovley D. R.
Nature Biotechnology **21**, 2003, 1229-1232
"Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells"

D

Debabov V.G.
Mikrobiologiya **77**, 2008, 149-157
"Electricity from microorganisms"

Dennis P. G., Guo K., Imelfort M., Jensen P., Tyson G. W., Rabaey K.
Bioresource Technology **129**, 2013, 599-605
"Spatial uniformity of microbial diversity in a continuous bioelectrochemical system"

E

Franks A. E., Nevin K. P., Jia H. F., Izallalen M., Woodard T. L., Lovley D. R.
Energy and Environmental Science **2**, 2009, 113-119
"Novel strategy for three dimensional real-time imaging of microbial fuel cell communities: monitoring the inhibitory effect of proton accumulation within bioanode biofilm"

Freguia S., Rabaey K., Yuan Z., Keller J.
Environmental Science Technology **42**, 2008, 7937-7943
"Syntrophic processes drive the conversion of glucose in Microbial Fuel Cell anodes"

Fricke F., Harnisch F., Schröder U.

Energy and Environmental Science **1**, 2008, 144-147

"On the use of cyclic voltammetry for the study of anodic electron transfer in microbial fuel cells"

I

Inoue K., Leang C., Franks A. E., Woodard T. L., Nevin K. P., Lovley D. R.

Environmental Microbiology Reports **2**, 2011, 211-217.

"Specific localization of the c-type cytochrome OmcZ at the anode surface in current-producing biofilms of *Geobacter sulfurreducens*"

J

Jain A., Gazzola G., Panzera A., Zanoni M., Marsili E.

Electrochimica Acta **56**, 2011, 10776-10785

"Visible spectroelectrochemical characterization of *Geobacter sulfurreducens* biofilms on optically transparent indium tin oxide electrode"

Jong B. C., Kim B. H., Chang I. S., Liew P. W. Y., Choo Y. F., Kang G. S.

Environmental Science Technology **40**, 2006, 6449-6454

"Enrichment, performance, and microbial diversity of a thermophilic mediatorless microbial fuel cell"

Jung S., Regan J. M.

Applied Microbial Technology, **77**, 2007, 393-402

"Comparison of anode bacterial communities and performance in microbial fuel cells with different electron donors"

K

Katuri K. P., Kavanagh P., Rengaraj S., Leech D.

Chemical Communications **46**, 2010, 4758-4760

"*Geobacter sulfurreducens* biofilms developed on different growth conditions on glassy carbon electrodes: insight using cycling voltammetry"

Kiely P. D., Regan J. M., Logan B. E.

Current opinion in Biotechnology **22**, 2011, 378-385

"The electric picnic: synergistic requirements for exoelectrogenic microbial communities"

Kim M. S., Lee Y. S.

International Journal of Hydrogen Energy **35**, 2010, 13028-13034

"Optimization of culture conditions and electricity generation using *Geobacter sulfurreducens* in a dual-chambered microbial fuel-cell"

Kim G. T., Webster G., Wimpenny J. W. T., Kim B. H., Kim H. J., Weightman A. J.

Journal of Applied Microbiology **101**, 2006, 698-710

"Bacterial community structure, compartmentalization and activities in a microbial fuel cell"

L

Logan B. E., Regan J. M.

TRENDS in Microbiology **14**, 2006

“Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells”

Lee H. S., Parameswaran P., Marcus K. A., Torres C. I., Rittmann B. E.

Water Research **42**, 2008, 1501-1510

“Evaluation of energy-conversion efficiencies in microbial fuel cells (MFCs) utilizing fermentable and non fermentable substrates”

Liu Y., Harnisch F., Fricke F., Sietman R., Schröder U.

Biosensors and Bioelectronics **24**, 2008, 1006-1011

“Improvement of the anodic bioelectrocatalytic activity of mixed culture biofilms by a simple consecutive electrochemical procedure”

M

Malvankhar N. S., Tuominen M. T., Lovley D. R.

Energy and Environmental Science **5**, 2012, 5790-5797

“Biofilm conductivity is a decisive variable for high-current-density *Geobacter sulfurreducens* microbial fuel cells”

Malvankhar N. S., Lau J., Nevin K. P., Franks A. E., Tuominen M. T., Lovley D. R.

Applied and Environmental Microbiology **16**, 2012, 5967-5971

“Electrical conductivity in a mixed-species biofilm”

Marcus A. K., Torres C. I., Rittman B. E.

Biotechnology and Bioengineering **6**, 2007, 1171-1182

“Conduction-based modeling of the biofilm anode of a microbial fuel cell”

Marsili E., Sun J., Bond D. R.

Electroanalysis **22**, 2010, 865-874

“Voltammetry and growth physiology of *Geobacter sulfurreducens* biofilms as a function of growth stage and imposed electrode potential”

P

Pant D., Van Bogaert G., Diels L., Vanbroekhoven K.

Bioresource Technology **101**, 2010, 1533-1543

“A review of substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production”

Parameswaran P., Zhang H., Torres C. I., Rittman B. E., Krajmalnik-Brown R.

Biotechnology and Bioengineering **105**, 2010, 69-78

“Microbial community structure in a biofilm anode fed with fermentable substrate: the significance of hydrogen scavengers”

Pinto R. P., Srinivasan B., Manuel M. F., Tartakovsky B.

Bioresource Technology **101**, 2010, 5256-5265

“A two-population bio-electrochemical model of a microbial fuel cell”

Patil S. A., Harnisch F., Kapadnis B., Schröder U.
Biosensors and Bioelectronics **26**, 2010, 803-808

"The role of temperature for biofilms formation and performances"

R

Rabaey K., Lissens G., Siciliano S. D., Verstraete W.
Biotechnological letters **25**, 2003, 1531-1535

"A microbial fuel cell capable of converting glucose to electricity at high rate and efficiency"

Rabaey K., Boon N., Siciliano S. D., Verhaege M., Verstraete W.
Applied Environmental Microbiology **70**, 2004, 5373-5382

"Biofuel cells select for microbial consortia that self-mediate electron transfer"

Rabaey K., Rodriguez J., Blackall L. L., Keller J., Gross P., Batstone D., Verstraete W., Nealon N. H.

The ISME Journal **1**, 2007, 9-18

"Microbial ecology meets electrochemistry: electricity-driven and driving communities"

Reguera G., Nevin K. P., Nicoll J. S., Covalla S. F., Woodard T. L., Lovley D. R.
Applied and Environmental Microbiology **72**, 2006, 7345-7348.

"Biofilm and Nanowire Production Leads to Increased Current in *Geobacter sulfurreducens* Fuel Cells"

Ren Z., Ward T. E., Regan J. M.
Environmental Science Technology **41**, 2007, 4781-4786

"Electricity production from cellulose in a microbial fuel cell using a defined binary culture"

Renslow R. S., Babauta J. T., Dohnalkova A. C., Boyanov M. I., Kemner K. M., Majors P. D., Fredrickson J. K., Beyenal H.

Energy and Environmental Science **6**, 2013, 1827-1836

"Metabolic spatial variability in electrode-respiring *Geobacter sulfurreducens* biofilms"

S

Speers A. M., Reguera G.
Applied Environmental Microbiology **78**, 2012, 437-444

"Electron donors supporting growth and electroactivity of *Geobacter sulfurreducens* anode biofilms"

T

Torres C. I., Andrew K. M., Rittman B. E.
Biotechnology and Bioengineering **100**, 2008, 872-881

"Proton transport inside the biofilm limits electrical current generation by anode respiring bacteria"

V

Velasquez-Orta S. B., Yu E., Katuri K. P., Head I. M., Curtis T. P., Scott K.
Applied Microbial Technology **90**, 2011, 789-798

"Evaluation of hydrolysis and fermentation rates in microbial fuel cells"

Y

Yang T. H., Coppi M. V., Lovley D. R., Sun J.

Microbial Cells Factories **9**, 2010

"Metabolic response of *Geobacter sulfurreducens* towards electron donor/acceptor variation"

Z

Zhang Y., Min B., Huang L., Angelidaki I.

Bioresource Technology **102**, 2011, 1166-1173

"Electricity generation and microbial community response to substrate changes in microbial fuel cell"

Chapitre 3

Greffage d'acides phényle
boroniques sur une électrode
et influence sur les
performances de bioanodes
microbiennes

Sommaire

Introduction	136
1 Point bibliographique sur les modifications de surface d'électrodes et intérêt des acides boroniques en tant que modifiants	138
1.1 Formation de biofilms bactériens et facteurs influençant l'adhésion de bactéries sur des surfaces abiotiques.....	138
1.2 Etat de l'art sur les modifications de surface pour l'amélioration des performances de bioanodes.....	139
1.2.1 <i>Modification de surface d'électrode visant à faciliter le transfert électronique des bactéries vers l'électrode.....</i>	<i>140</i>
1.2.2 <i>Modifications visant à améliorer l'affinité des bactéries pour la surface des électrodes</i>	<i>145</i>
1.2.3 <i>Récapitulatif et discussion sur l'effet des modifications de surface</i>	<i>150</i>
1.3 Réactivité des acides boroniques et propriétés des membranes des bactéries.....	152
1.4 Principe du greffage électrochimique de sels d'aryle diazonium pour modifier les propriétés de surface d'électrodes.....	156
2 Etude du greffage d'acides boroniques sur des surfaces d'électrode et de leur influence sur les performances d'anodes microbiologiques dans des piles à combustible.....	159
2.1 Etude du procédé de fonctionnalisation.....	159
2.1.1 <i>Généralités sur le procédé de fonctionnalisation et introduction aux études menées</i>	<i>159</i>
2.1.2 <i>Etude du procédé de fonctionnalisation</i>	<i>160</i>
2.1.3 <i>Transfert électronique sur la surface fonctionnalisée</i>	<i>162</i>
2.1.4 <i>Caractérisation des surfaces fonctionnalisées par spectroscopie infrarouge ...</i>	<i>165</i>
2.1.5 <i>Conclusion de la partie 2.1.....</i>	<i>168</i>
2.2 Influence des acides boroniques greffés à l'anode sur le temps de latence, la catalyse des réactions d'oxydation et la puissance délivrée	169
2.2.1 <i>Temps de formation du biofilm anodique</i>	<i>170</i>

2.2.2	<i>Puissances délivrées par les piles à combustible microbiologiques.....</i>	171
2.2.3	<i>Catalyse de la réaction d'oxydation de l'acétate par le biofilm anodique</i>	172
2.2.4	<i>Aspect des biofilms microbiens.....</i>	175
2.2.5	<i>Reproductibilité des résultats</i>	178
Conclusion et Perspectives.....		182
3	Section expérimentale du chapitre 3.....	184
3.1	Modification d'électrode par greffage électrochimique de sels d'aryle diazonium .	184
3.1.1	<i>Synthèse du sel de paradiazophenylboronique pinacol ester.....</i>	184
3.1.2	<i>Modification électrochimique des électrodes à partir de l'acide 4 aminophenyle boronique pinacol ester.....</i>	186
3.1.3	<i>Etude des surfaces modifiées.....</i>	186
3.2	Etudes expérimentales des piles.....	189
Références du Chapitre 3.....		192

Introduction

La formation et l'organisation des biofilms bactériens sont des phénomènes complexes étudiés dans divers domaines de recherche. La capacité de certaines espèces bactériennes à adhérer sur des surfaces et former des biofilms est par exemple particulièrement étudiée dans les domaines médical et agroalimentaire, où leur présence est indésirable et pose des problèmes de santé publique. La recherche dans ces domaines tend donc à développer des stratégies permettant de prévenir la formation des biofilms. Par ailleurs, certaines technologies de traitement des eaux et de digestion anaérobie font intervenir des microorganismes immobilisés sur des surfaces (techniques d'épuration par culture fixées par exemple) et la recherche dans ces domaines visent à améliorer l'adhésion des bactéries. Si les mécanismes de la formation des biofilms ne sont pas entièrement compris et dépendent des souches microbiennes impliquées, les propriétés physico-chimiques de la surface colonisée par le biofilm sont reconnues comme des facteurs essentiels dans l'adhésion des bactéries.

Dans le domaine des systèmes microbioélectrochimiques, l'interface bactéries-électrode est à plus forte raison importante car les propriétés de surface de l'électrode conditionnent non seulement l'adhésion des bactéries mais aussi les performances électriques de la bioanode. Ainsi, une grande partie de la recherche sur les systèmes microbioélectrochimiques se concentre sur l'optimisation des propriétés de surfaces des électrodes en vue de la colonisation bactérienne. Les matériaux d'électrodes les plus utilisés sont les matériaux carbonés sous différentes formes (Rinaldi et al. 2008) : le graphite sous forme de plaques, feutres, brosses, le carbone vitreux simple ou réticulé, les nanotubes de carbone ou encore le graphène. Le carbone est en effet un matériau de choix pour les systèmes microbioélectrochimiques à cause de sa biocompatibilité, sa bonne conductivité et son coût relativement faible. Cependant ses propriétés de surface peuvent être modulées afin d'augmenter les performances des systèmes.

Ainsi, une seconde partie de ce travail de thèse a été consacré à l'amélioration de l'interface bactéries/électrodes grâce à une stratégie de modification inédite par rapport aux travaux publiés jusqu'ici. Cette modification consiste à greffer de façon covalente sur la surface d'électrode, des molécules connues pour réagir de façon spécifique avec des molécules de la membrane externe des bactéries électroactives : les lipopolysaccharides.

Une première partie de ce chapitre 3 sera consacrée à comprendre comment les propriétés de la surface à coloniser influencent la formation d'un biofilm bactérien. Cette première partie permettra de faire une mise au point sur les différentes stratégies envisagées jusqu'ici dans le domaine des systèmes microbioélectrochimiques pour améliorer l'interface bactéries/électrodes. Puis la stratégie de modification qui fait l'objet de ce chapitre sera présentée : le choix du modifiant sera explicité et la méthode de modification choisie sera détaillée.

Dans une seconde partie, l'étude de la fonctionnalisation sera présentée ainsi que les performances des électrodes modifiées introduites comme anodes dans des piles à combustible microbiologiques.

1 Point bibliographique sur les modifications de surface d'électrodes et intérêt des acides boroniques en tant que modifiants

1.1 Formation de biofilms bactériens et facteurs influençant l'adhésion de bactéries sur des surfaces abiotiques

Afin de comprendre comment la modification de surface d'électrode peut améliorer la connexion du biofilm électroactif sur des électrodes, il est nécessaire de se pencher sur la formation d'un biofilm bactérien. On appelle biofilm bactérien, un consortium bactérien adhérant sur une surface et enveloppé dans une matrice excrétée par les bactéries elles-mêmes (Costerton et Lappin-Scott, 1995).

La formation du biofilm se décompose en plusieurs étapes (Costerton et al. 2005, Mack et al. 2005).

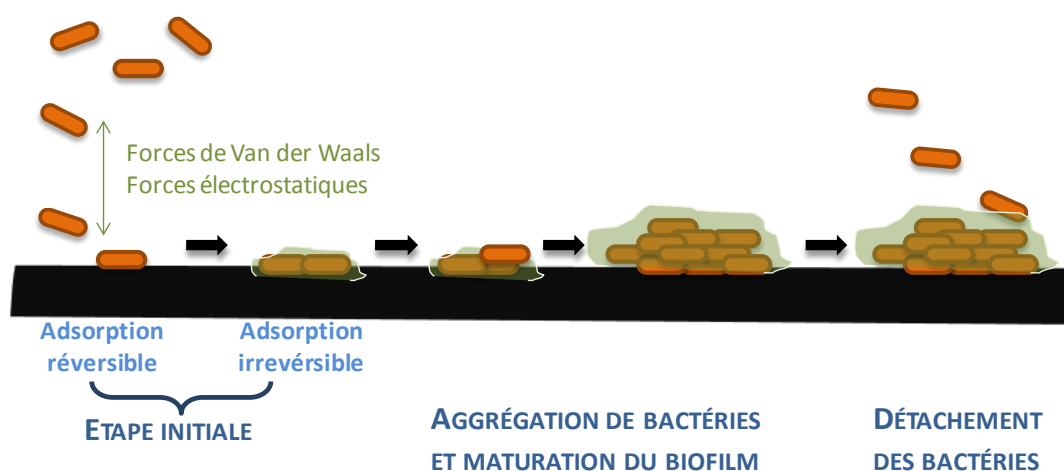


Figure 1 Schéma des étapes de formation d'un biofilm bactérien

La première étape est l'adhésion de cellules bactériennes en suspension sur la surface à coloniser. Puis, d'autres bactéries s'agrègent autour des premières immobilisées et s'accumulent en couches multiples. On assiste alors à une maturation du biofilm avec l'établissement d'un métabolisme distinct des bactéries lorsque celles-ci sont impliquées dans le biofilm. Ces changements permettent une interaction complexe entre les bactéries du biofilm notamment pour favoriser l'adhésion interbactérienne et les échanges de métabolites ou d'électrons. Une matrice extracellulaire est aussi sécrétée et enveloppe les bactéries du biofilm. Selon les espèces bactériennes, elle comprend des molécules très variées : des exopolysaccharides, des protéines, ou encore de l'ADN extracellulaire. Cette matrice forme alors un gel assurant la cohésion du biofilm et lui assure une résistance à diverses agressions extérieures. Après cette étape de

maturation, certaines bactéries du biofilm peuvent se détacher, redevenir des cellules dites planctoniques (en suspension) et initier une colonisation ailleurs sur la surface.

L'importance de la phase initiale d'adhésion des bactéries est souvent au cœur de la recherche sur les biofilms. En effet, selon certains auteurs (Busscher et al. 1995, Gottenbos et al. 1999, 2000, Hibya et al. 2000, Terada et al. 2005), cette phase initiale affecterait l'ensemble de la formation du biofilm bien que les bactéries pionnières impliquées dans cette première adhésion soient en nombre très faible par rapport au nombre total de bactéries formant le biofilm mature. Cette étape initiale d'adhésion des cellules est conditionnée par un certain nombre d'interactions entre les bactéries et la surface à coloniser, telles que des interactions de Van der Waals et des interactions électrostatiques. Ces interactions permettent tout d'abord une adsorption passive et réversible des bactéries sur la surface (Gauthier et al. 1989), puis les bactéries adsorbées commencent à excréter des substances ou des appendices extracellulaires leur permettant d'adhérer de façon irréversible.

Ainsi, les caractéristiques de la surface à coloniser, que ce soit en termes de topologie (en offrant plus de surface colonisable par les bactéries) ou que ce soit en termes de composition chimique, peuvent avoir une influence sur la formation du biofilm. C'est pourquoi la modification de ces surfaces est un moyen de prévenir ou de favoriser l'installation des biofilms. Dans le cas particulier des systèmes électroactifs, un paramètre supplémentaire influence l'adhésion des bactéries et les performances du biofilm. Il s'agit de la capacité du matériau à permettre un transfert électronique interfacial suffisamment rapide puisque cette surface est une électrode qui est utilisée par le biofilm comme accepteur ou donneur d'électrons.

1.2 Etat de l'art sur les modifications de surface pour l'amélioration des performances de bioanodes

La modification de surface d'anodes dans les systèmes microbioélectrochimiques est un domaine de recherche très actif. Une panoplie très large de techniques de modification de surface a été testée afin d'améliorer l'adhésion et la connexion du biofilm électroactif. Parmi ces techniques, on retrouve des traitements thermiques, des traitements physico-chimiques, l'ajout de fonctions chimiques sur les surfaces sous la forme de molécules ou de polymères, ou encore l'ajout de métaux ou d'oxydes métalliques. Les modifications utilisées peuvent avoir des conséquences diverses sur les propriétés de surfaces des électrodes, comme :

- l'augmentation de la surface spécifique accessible aux bactéries
- la modulation de l'hydrophobicité et de la charge de surface
- la modulation de l'électroactivité (ajout de particules métalliques, médiateurs redox...)
- l'introduction de fonctions spécifiques ayant une affinité spécifique pour des molécules de la membrane bactérienne : stratégie inédite dont les résultats font l'objet de ce chapitre et d'une publication (Lapinsonnière et al. 2013)

Suivant les techniques utilisées, les conséquences sur les propriétés de surface et sur l'interaction avec les bactéries peuvent être plus ou moins spécifiques. Dans cette mise au point bibliographique sur les modifications, nous avons choisi de regrouper les modifications visant à faciliter le transfert électronique entre les bactéries et l'anode (ajout de particules métalliques et de médiateurs redox) et celles visant à augmenter l'affinité des bactéries pour la surface des électrodes. Nous verrons alors qu'il est en réalité difficile d'attribuer l'augmentation des performances des bioanodes à un seul effet précis d'une modification et que la frontière entre les modifications influençant seulement la connexion des bactéries ou seulement l'adhésion des bactéries est ténue.

1.2.1 Modification de surface d'électrode visant à faciliter le transfert électronique des bactéries vers l'électrode

Une grande partie des premières modifications de surface d'anode a été consacrée à faciliter le transfert hétérogène des électrons du biofilm vers l'électrode. Ces modifications consistent notamment à immobiliser à la surface d'électrodes de carbone des métaux ou des oxydes métalliques, des médiateurs redox ou encore à recouvrir l'électrode d'un polymère conducteur.

Immobilisation de particules métalliques

Les électrodes métalliques ont une conductivité plus importante que les matériaux carbonés, et possèdent donc une résistance moins importante au transfert hétérogène des électrons. Cependant, leur coût et leur disponibilité sont des freins au développement des technologies microbioélectrochimiques. Une alternative intéressante permettant de profiter à la fois des avantages des matériaux carbonés et de la bonne conductivité des métaux est d'immobiliser des particules métalliques sur des électrodes de carbone.

Ainsi, Fan et al. (2011) ont par exemple employé la méthode de pulvérisation cathodique afin de déposer des nanoparticules d'or et de palladium en couche mince sur du graphite. Cette méthode consiste à appliquer un potentiel entre l'échantillon à modifier (anode) et un matériau métallique (cathode) dans une atmosphère inerte (typiquement de l'argon) afin de former un plasma. Les particules positives générées (ions Ar^+) sont attirées et accélérées vers la cathode. Leur impact sur cette surface entraîne la pulvérisation de la matière métallique qui est éjectée et vient se déposer sur l'échantillon (anode). Dans cette étude, les particules ainsi déposées sur l'électrode recouvrent entre 10 et 20 % de la surface (Fan et al. 2011). Les auteurs ont observé une génération de courant supérieure par les biofilms de *Shewanella oneidensis* développés sur les particules d'or et de palladium par rapport aux biofilms développés sur graphite simple. Dans le cas des électrodes d'or, les auteurs ont montré que plus les particules utilisées étaient volumineuses (diamètres de particules compris entre 0.2 et 1 μm) plus les courants délivrés étaient importants. Dans le cas des particules de palladium, il n'existe pas de corrélation entre la taille des particules et les courants délivrés. Ces résultats suggèrent donc qu'il existe bien un effet de la nature des particules sur les performances des anodes modifiées. Il est peu probable au vu de la taille des particules que la modification entraîne une plus grande surface disponible pour les bactéries. Cependant selon les auteurs, la modification entraîne une augmentation de la surface disponible pour les transferts électroniques par l'intermédiaire de médiateurs redox sécrétés. Cette hypothèse reste réaliste car *S. oneidensis* est connue pour sécréter des médiateurs de type flavine pour le transfert électronique vers l'électrode. Les auteurs proposent également que les particules déposées permettent un contact meilleur entre les bactéries et l'électrode. Avec cette étude, on constate qu'il est difficile d'attribuer l'effet d'une modification à un paramètre particulier. Ici, l'ajout de particules métalliques ne change pas seulement les propriétés électriques de la surface mais elles en changent aussi la topographie ainsi que les forces d'adhésion exercées par la surface. De plus, sur la base de données non publiées, les auteurs suggèrent que l'exposition des bactéries aux particules entraîne une modification de l'expression des gènes. Il serait donc possible que l'ajout des particules ait un effet encore plus profond sur le métabolisme bactérien.

Dans une autre étude, Lowy et al. (2006) ont cherché à changer la composition d'une anode en graphite en y incorporant des sels de manganèse MnSO_4 , des sels de nickel NiCl_2 ou encore des oxydes de fer Fe_3O_4 . Les auteurs se sont intéressés aux cinétiques de transfert de charge à l'interface entre l'électrode en mesurant les courants d'échanges i_0 aux bioanodes. Pour de faibles surtensions, les électrodes modifiées présentent des courants d'échange i_0 environ deux

fois supérieurs à ceux d'une bioanode développée sur graphite simple, ce qui montre que les transferts électroniques des biofilms vers les électrodes modifiées sont plus rapides que vers l'électrode de graphite simple. Dans le cas d'une anode contenant à la fois des sels de manganèse et de nickel, la pile à combustible microbiologique délivre une puissance 5 fois supérieure à celle d'une pile fonctionnant avec une anode de graphite simple. Selon les auteurs, les particules de manganèse et de nickel ajoutées à l'anode permettent d'augmenter les performances en jouant le rôle de médiateurs du transfert électronique entre les bactéries et l'électrode. Dans le cas de l'anode modifiée avec des oxydes de fer, on peut se demander ce que deviennent les oxydes de fer une fois qu'ils sont réduits et s'ils ne diminuent pas la conductivité de l'anode.

L'effet bénéfique d'une modification d'électrode par ajout d'oxydes de fer avait déjà été mis en évidence dans une étude antérieure (Kim et al. 2005). Dans cette étude, les auteurs ont immobilisé des particules d'oxydes de fer en couche mince sur des électrodes de carbone poreux par dépôt en phase vapeur. Les auteurs rapportent que ce dépôt a permis d'augmenter de 27 % les courants délivrés par les bioanodes par rapport à une électrode non modifiée. De plus, les auteurs montrent que la production (indésirable) de méthane par la bioanode est retardée lorsque le biofilm se développe sur l'anode modifiée par les oxydes de fer et que l'efficacité faradique est alors augmentée. Ces observations indiquent que sur l'électrode modifiée par des oxydes de fer, le développement des bactéries électroactives est favorisé par rapport à celui de microorganismes indésirables telles que les méthanogènes. Afin d'expliquer ce phénomène, les auteurs proposent qu'en permettant aux bactéries électroactives d'utiliser des oxydes de fer, qui sont leurs accepteurs d'électrons naturels, on offre un avantage sélectif plus important à ces espèces bactériennes. Ce léger avantage sélectif permet un développement efficace des bactéries électroactives sur les électrodes modifiées avec des oxydes de fer. Ce développement plus efficace n'est attesté que par les courants délivrés et les efficacités faradiques plus élevés. Il peut y avoir deux explications à ces meilleures performances. Une première explication serait le nombre plus élevé de bactéries connectées sur l'électrode modifiée avec des oxydes de fer que sur l'électrode de graphite non modifiée. Une seconde explication serait qu'à quantité égale de bactéries sur les deux électrodes, la connexion des bactéries est plus efficace sur l'électrode modifiée. Ici encore se pose la question du devenir des oxydes de fer une fois qu'ils sont réduits par les bactéries électroactives. Les analyses chimiques présentées par les auteurs de l'étude montrent que ces oxydes de fer attachés à l'électrode pourraient se dissoudre dans l'anolyte une fois réduit. Ce dernier point est cohérent avec la concentration croissante en ions ferreux

détectés en solution durant le fonctionnement de la pile utilisant l'électrode modifiée avec des oxydes de fer.

Utilisation de polymères conducteurs

Moduler l'électroactivité d'électrodes de carbone ne se fait pas forcément par l'ajout de particules métalliques en surface d'électrode de carbone. Plusieurs études (Scott et al. 2007, Zou et al. 2008, Jiang et Li 2009, Zhao et al. 2010) ont ainsi montré que des polymères conducteurs tels que la polyaniline ou le polypyrrole, recouvrant des électrodes de carbone permettaient d'augmenter les puissances délivrées.

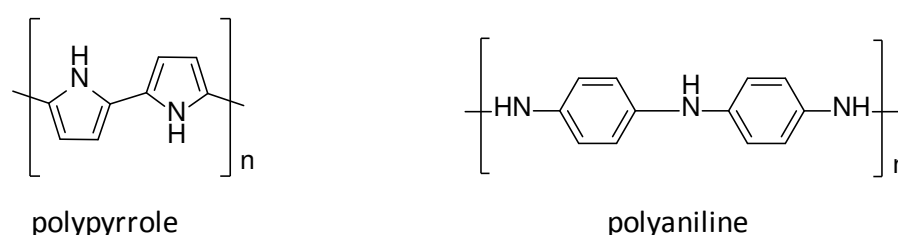


Figure 2 Structures des polymères conducteurs utilisés pour modifier des bioanodes

Les études montrent que les meilleures performances des biofilms bactériens sur polymères conducteurs peuvent être attribuées à la combinaison de plusieurs facteurs. Scott et al. (2007) montrent que les piles délivrent des puissances supérieures lorsqu'elles fonctionnent avec des biofilms développés sur des anodes modifiées par des polymères de polyaniline par rapport aux puissances délivrées lorsqu'elles utilisent des biofilm développés sur des électrodes non modifiées. Les auteurs attribuent ces meilleures performances à une augmentation de la conductivité de l'électrode modifiée par le polymère et à l'introduction de fonctions quinoïdes qui faciliteraient le transfert électronique hétérogène en agissant comme un relais électronique entre les bactéries et l'électrode. Un deuxième effet de la polyaniline proposé par les auteurs est l'augmentation de la surface spécifique de l'électrode. En effet, le polymère modifie la topographie de l'électrode en constituant un réseau tridimensionnel et en augmente la rugosité et la surface spécifique. En examinant les électrodes modifiées par la polyaniline par Microscopie Electronique à Balayage (MEB), on constate cependant que la modification n'augmente pas la surface disponible pour la colonisation bactérienne car les aspérités créées sont trop petites par rapport à la taille moyenne des bactéries électroactives (0.2 à 1 µm de diamètre et 1 à 5 µm de longueur). Les auteurs proposent cependant que le polymère augmente la surface disponible

pour la réduction de médiateurs solubles sécrétés par les bactéries pour le transfert d'électrons à l'anode.

En 2010, une étude de Zhao et al. vient corroborer ces hypothèses. Les auteurs modifient des électrodes avec des polymères de polyaniline dont ils font varier la structure. Ils étudient un dépôt de polymère plan et sans aspérité et un dépôt de polymère présentant une architecture nanostructurée avec des pores compris entre 10 et 100 nm. Le biofilm issu d'un inoculum mixte et développé sur le polymère plan permet d'augmenter le courant délivré par le biofilm d'un facteur 4 par rapport à une électrode non modifiée. Selon les auteurs, le dépôt de polymère fin et plan n'augmente pas la surface spécifique de l'électrode, ainsi l'amélioration des performances ne serait due qu'aux propriétés du matériau vis-à-vis du transfert d'électrons. Lorsque le biofilm se développe sur un polymère nanostructuré, le courant délivré est 8 fois plus important que sur le polymère plan. Cette fois-ci, l'augmentation peut aussi être attribuée à l'augmentation de la surface de l'électrode modifiée par le polymère nanostructuré. La taille des pores ne permettant pas une colonisation plus importante des bactéries, les auteurs proposent que le polymère augmente la surface disponible pour la réduction de médiateurs redox solubles sécrétés par les bactéries pour le transfert d'électrons à l'anode. Cette hypothèse est appuyée par des mesures de fluorescence montrant la présence de médiateurs redox dérivés de quinones en quantité légèrement plus importante dans l'anolyte du biofilm développés sur polymère nanostructuré. Les auteurs ne fournissent pas de données concernant l'épaisseur du polymère nanostructuré mais il n'est pas exclu que du fait de son épaisseur et non des pores, le polymère augmente la surface disponible pour la colonisation bactérienne. Il y aurait alors légèrement plus de bactéries sur ce polymère nanostructuré.

Immobilisation de médiateurs redox du transfert électronique

Une autre stratégie permettant de moduler l'électroactivité de l'anode consiste à immobiliser des médiateurs redox en surface de la bioanode. Ces médiateurs redox artificiels sont connus pour jouer le rôle de relais électronique entre des bactéries et des électrodes. La première étude montrant l'efficacité de cette stratégie implique une culture de *Desulfovibrio desulfuricans* et le viologène polymérisé (structure **Figure 3**) comme médiateur redox immobilisé à la surface d'une électrode (Park et al. 1997). D'autres médiateurs ont ensuite été étudiés. Ainsi Park et al. ont immobilisé du rouge neutre (structure **Figure 3**) sur des électrodes. Leur procédure consiste à introduire des fonctions carboxyliques en surface par oxydation chimique du matériau d'électrode. L'étape suivante de la fonctionnalisation consiste à former des liaisons amide entre

ces fonctions carboxylates et le rouge neutre en utilisant le N,N'-dicyclohexylcarbodiimide comme agent d'activation des fonctions carboxyliques. Les auteurs ont observé que la modification a permis de doubler la génération de courant sur une électrode de graphite (Park et Zeikus 2000), et de la multiplier par 10 sur tissus de carbone (Park et al. 2002). D'autres médiateurs redox ont été utilisés comme l'antraquinone-1,6-disulfonic acid, AQDS (structure **Figure 3**) et la 1,4-naphtoquinone (structure **Figure 3**) (Lowy et al. 2006, Lowy et Tender 2008). Récemment, Patil et al. (2012) ont étudié l'effet d'un polymère redox composé de complexes d'osmium (Os^{II}/Os^{III}) sur polymère de polyvinyle imidazole immobilisé sur une bioanode microbienne. Ce polymère redox a permis de réduire de 20 h le temps de formation d'un biofilm électroactif de *Shewanella oneidensis* et d'augmenter le courant généré d'un facteur 4 par rapport à une électrode non modifiée. Les images MEB de l'électrode modifiée montrent que la surface colonisable par les bactéries n'est pas augmentée par le polymère immobilisé. L'augmentation des performances sur l'électrode modifiée est donc attribuée à un transfert électronique hétérogène facilité entre bactéries et électrodes grâce aux complexes d'osmium.

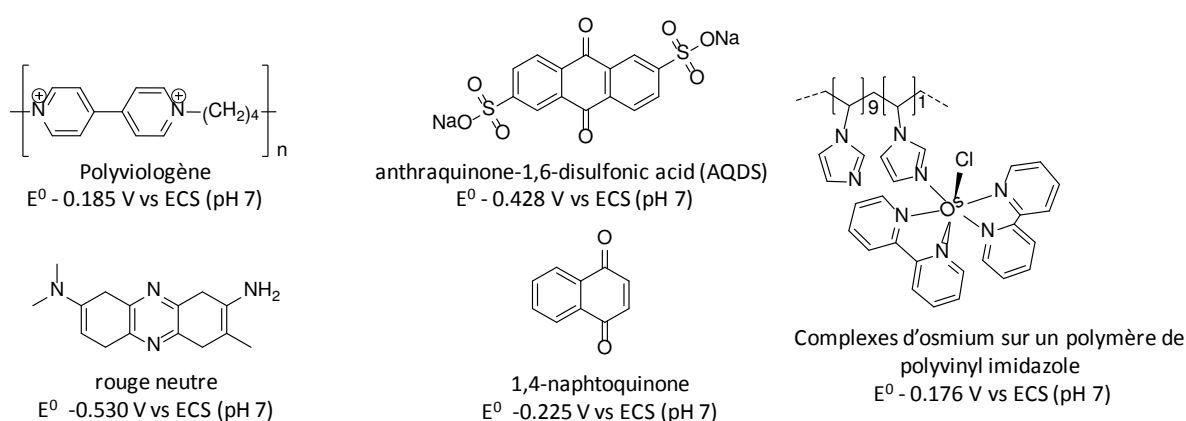


Figure 3 Structures des médiateurs redox immobilisés sur des bioanodes

1.2.2 Modifications visant à améliorer l'affinité des bactéries pour la surface des électrodes

Traitements de surface non spécifiques

Les premiers essais d'amélioration des propriétés de surfaces d'anodes afin d'augmenter leur affinité pour des biofilms électroactifs ont été réalisés par des traitements de surface physico-chimiques assez agressifs tels que des traitements thermiques, acides ou oxydant.

Par exemple, Cheng et Logan (2007) ont utilisé un procédé de fonctionnalisation d'électrode consistant à faire chauffer l'électrode en présence de gaz ammoniacal. Ils ont montré qu'un tel traitement sur des électrodes en tissus de carbone permettait d'augmenter la puissance d'une

bioanode de 20 % par rapport à une anode non traitée et de réduire le temps de formation du biofilm de moitié. Selon les auteurs, cette amélioration des performances a été attribuée à la génération de fonctions chargées positivement sur la surface de l'électrode. Ces fonctions chargées positivement augmenteraient l'attraction électrostatique entre les bactéries électroactives globalement chargées négativement et la surface de l'électrode. Les fonctions introduites en surface n'ont pas été étudiées et analysées. Les résultats publiés ne permettent pas de savoir si la modification entraîne l'adhésion d'un plus grand nombre de bactéries ou si l'effet observé est simplement dû à une amélioration du transfert hétérogène des électrons à la surface des anodes. De même Wang et al. (2009) ont montré que des traitements à l'ammoniac et des traitements thermiques permettaient d'augmenter légèrement les puissances de 7 et 3 % sur des électrodes en mailles de carbones. Les auteurs ont attribué cette amélioration de performances à plusieurs facteurs. Tout d'abord, le traitement augmente la surface électrochimique de l'électrode mesurée à l'aide du ferricyanure utilisé comme sonde redox. Cette mesure ne permet pas de savoir si l'augmentation de surface entraîne une augmentation de la surface disponible pour les bactéries ou si elle permet d'augmenter la surface disponible pour l'oxydo-réduction de médiateurs sécrétés. De plus, le rapport azote sur carbone de la surface a été augmenté alors que le rapport oxygène sur carbone (mesuré par spectrométrie photoélectronique à rayon X, XPS) diminue ce que les auteurs attribuent à une élimination d'impureté organiques de la surface de l'électrode qui limiteraient le transfert électronique interfacial à l'électrode. Ce traitement augmente de plus le rapport N/C à l'électrode ce qui augmenterait l'affinité des bactéries vers la surface de l'anode. Ce dernier phénomène n'est pas expliqué, d'autant plus que la nature des fonctions générées n'a pas été étudiée. Une hypothèse plausible est que le traitement entraîne la formation d'amines primaires en surface d'électrodes. En effet, d'autres études ont montré que le polissage d'électrodes de carbone vitreux en présence d'ammoniac entraînait la formation d'amines immobilisées de façon covalente sur la surface (Anne et al. 1998). Ces groupements pourraient augmenter l'hydrophilicité de la surface et/ou entraîner la formation de charges positives (par protonation des amines) à la surface de l'électrode attirant les bactéries chargées négativement. Si le mécanisme d'action de cette modification n'est pas connu, d'autres études décrivent le même effet bénéfique par augmentation du rapport N/C de la surface des électrodes.

Ainsi, Feng et al. (2010) proposent les mêmes hypothèses pour expliquer l'augmentation de 8% des puissances délivrées suite à la modification d'électrode par une combinaison de traitement thermique et d'acide nitrique. À l'aide d'une technique d'adsorption de gaz, les

auteurs montrent que la surface spécifique des électrodes est augmentée par ce traitement. Cette mesure est confirmée par les images de Microscopie Electronique à Balayage montrant que le traitement provoque la formation de craquelures en surface d'électrode. Ces craquelures sont de taille suffisante pour augmenter la surface disponible pour la colonisation bactérienne, ce qui explique en partie l'augmentation des puissances délivrées. Les mesures XPS montrent également l'augmentation du rapport N/C après le traitement thermique en présence d'acide nitrique. Après analyse des spectres XPS, les auteurs attribuent cette augmentation du rapport N/C à l'introduction de fonctions amines tertiaires et de fonctions ammonium en surface de l'électrode. Ces fonctions en surface des électrodes sont chargées positivement à pH 7 ce qui devrait augmenter l'attraction des bactéries électroactives, connue pour être chargées négativement.

Un autre travail concerne une modification de surface en présence d'acide nitrique par oxydation électrochimique d'une électrode en maille de carbone (Zhou et al. 2012). L'anode modifiée permet une augmentation de 40 % de la puissance délivrée par la pile attribuée en partie à une augmentation de la surface disponible pour la colonisation bactérienne due à la formation de craquelures sur l'électrode traitée. D'autres traitements consistent à oxyder électrochimiquement la surface de l'électrode dans de l'acide sulfurique (Lowy et Tender 2008, Tang et al. 2011). Les augmentations de puissance rapportées sont de 40 à 60 % par rapport à une pile utilisant une anode non modifiée et sont attribuées à la présence de groupements carboxyles. Ces groupements seraient capables de former des liaisons hydrogènes avec les peptides (Crittenden 2006, Lowy et al. 2006, Stams et al. 2006) présents en surface des bactéries électroactives, certains peptides peuvent appartenir à des cytochromes membranaires de type c.

Modifications de surface spécifiques

Par la suite, des traitements plus spécifiques, consistant à introduire de façon contrôlée des électrodes des fonctions chimiques sur la surface, ont été testés.

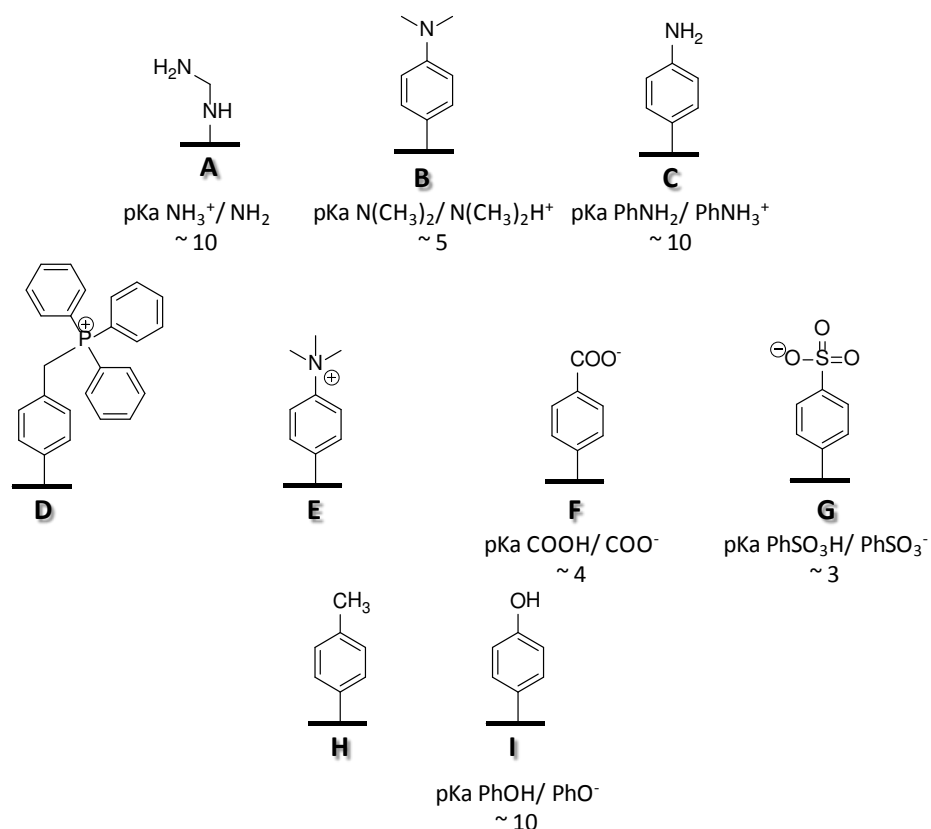


Figure 4 Structures des molécules déjà utilisées pour modifier des bioanodes (de gauche à droite : A éthylènediamine, B diméthyle aniline, C aniline, D acide benzoïque, E benzyle triphényle phosphonium)

On peut citer par exemple, les travaux de Zhu et al. 2011, qui ont consisté à greffer de façon covalente des fonctions éthylène diamine sur des feutres de carbone activé. La procédure de fonctionnalisation se décompose en plusieurs étapes. La surface de l'électrode est en carbone activé et comporte des fonctions carboxyliques. Ces fonctions carboxyliques sont activées avec du chlorure de thionyle SOCl_2 et afin de former des liaisons amide avec l'éthylène diamine. L'électrode ainsi modifiée (**Figure 4A**) a permis de réduire le temps de formation du biofilm de moitié et d'augmenter les puissances de 25%. Les auteurs attribuent l'augmentation des puissances à la présence de fonctions amides et amines sur l'électrode modifiée. Ces fonctions amides augmenteraient l'affinité des bactéries pour la surface de l'électrode. En effet, les auteurs affirment que les biofilms sont épais sur l'électrode modifiée alors qu'ils sont discontinus sur l'électrode non modifiée, d'après des images de Microscopie Electronique à Balayage des bioanodes non publiées dans l'étude. Cette modification augmente aussi le rapport N/C mesuré par XPS, ce qui rejoint les résultats d'autres études précédemment citées. Pour expliquer l'augmentation de l'affinité entre les bactéries et la surface de l'électrode, les auteurs proposent que les fonctions introduites augmentent l'hydrophilicité de l'électrode. On peut aussi penser que les fonctions introduites ici sont protonées au pH de l'électrolyte (pH 7) et qu'elles

apportent alors des charges positives qui augmentent l'attraction électrostatiques entre les bactéries électroactives chargées négativement et l'électrode.

L'hypothèse de l'effet bénéfique des fonctions amines sur la biocompatibilité des électrodes est corroborée par deux autres études rapportant les greffages covalents de dimethylaniline (**Figure 4B**) (Saito et al. 2011) et d'aniline (**Figure 4C**) (Picot et al. 2011) sur la surface d'électrodes. Pour ces deux études, les pKa des molécules et/ou des analyses XPS suggèrent que les fonctions amines ne sont pas protonées au pH de l'anolyte (environ 7). Ces modifications permettent d'augmenter les puissances délivrées jusqu'à 24% et 44% respectivement par rapport à une électrode non modifiée. Ici, les résultats montrent que l'effet bénéfique des fonctions amines greffées n'est pas due à l'introduction de charges positives en surface d'électrode ; cependant les données des deux études ne permettent pas de déterminer si les modifications entraînent une adhésion plus importante des bactéries ou si elles entraîne une meilleure connexion des bactéries en surface.

L'étude de Picot et al. (2011) citée ci-dessus, est une étude réalisée par notre équipe (Thèse de Matthieu Picot, 2012). Il s'agit de la première étude mettant en lumière les enjeux et les intérêts de la modification de surface d'électrodes par réduction de sels d'aryle diazonium en vue de l'amélioration des performances d'un biofilm électroactif. En effet, cette étude a tout d'abord permis de démontrer le lien entre le degré de modification appliqué, les propriétés de transfert électroniques des électrodes modifiées et les performances des biofilms anodiques développés. Ces résultats montrent la nécessité de contrôler le degré de modification, voire de l'optimiser, comme nous le détaillerons plus loin. Au-delà de l'influence du degré de modification (testée avec le groupement aniline greffé, **Figure 4C**), notre étude a également permis d'étudier l'influence des charges portées par les couches de polyphénylènes greffées sur les performances de biofilms électroactifs. Deux fonctions greffées de façon covalente sur des électrodes ont été testées : la fonction triphénylphosphonium (**Figure 4D**), chargée positivement et la fonction benzoate chargé négativement à pH 7 (**Figure 4F**). La modification apportant une charge positive permet d'augmenter les puissances de 67% alors que la modification apportant une charge négative entraîne une baisse des puissances par rapport à une électrode contrôle non modifiée. Ces meilleures performances sont à relier avec le niveau de colonisation par des bactéries électroactives. En effet, sur l'anode modifiée, le biofilm est épais et constitué majoritairement de bactéries de type *Geobacter sulfurreducens* alors que sur l'électrode non modifiée, la colonisation bactérienne est moins importante et parmi les bactéries

adhérées, *G. sulfurreducens* n'est pas l'espèce majoritaire. Une explication raisonnable de ces résultats serait l'effet d'attraction et de répulsion électrostatique entre la couche de modifiant et les bactéries chargées négativement, ce qui rejoint les résultats de Cheng et Logan (2007) et corrobore un postulat largement admis dans les études concernant les biofilms non électroactifs (Rasmussen et Østgaard 2003).

Dans le même esprit, Guo et al. (2013) se sont intéressés à l'effet de la charge et de l'hydrophilicité de fonctions chimiques greffées par réduction de sels d'aryle diazonium. En accord avec les travaux de Picot et al. (2011), les auteurs montrent que les biofilms développés sur des anodes portant une charge positive (triméthyle ammonium, **Figure 4E**) génèrent un courant 1.2 à 1.5 plus élevé que les anodes modifiées par un groupement neutre (hydroxyle, **Figure 4I**). Les biofilms développés sur des anodes portant une charge négative (sulfonate, **Figure 4G**) génèrent un courant plus faible d'un facteur 1.2 à 1.4 que les anodes modifiées par un groupement neutre. Ces résultats ont été reliés à la quantité de cellules constituant le biofilm ainsi qu'à la prédominance de bactéries de l'espèce *Geobacter*, évaluées par microscopie à hybridation en fluorescence *in situ* (FISH) et par voltamétrie cyclique. D'autre part, Guo et al. (2013) démontrent l'effet négatif d'une modification hydrophobe (toluène **Figure 4H**). Sur de telles modifications hydrophobes, le développement du biofilm est inhibé, ce qui résulte en un courant délivré très faible. Les images prises par microscopie FISH montrent un développement du biofilm non uniforme sur la surface de l'électrode, avec une croissance en champignon à partir de quelques points de la surface. Ces points de croissance pourraient être des emplacements non modifiés de la surface d'électrode. En effet, au vu du degré de modification faible utilisé dans cette étude (0.1 mC.cm^{-2} , soit un ordre de grandeur plus faible que les degrés de modification que nous avons utilisés), il est probable que la modification ne forme pas une couche uniforme sur la surface de l'électrode.

1.2.3 Récapitulatif et discussion sur l'effet des modifications de surface

Nous avons décrit les travaux jusqu'ici entrepris pour améliorer l'interaction entre les bactéries électroactives et les électrodes. Bien que cette revue bibliographique ait été organisée de façon à séparer les modifications suivant les intentions premières des auteurs – faciliter les transferts électroniques entre les bactéries et l'électrode ou améliorer le caractère biocompatible de la surface colonisable par les bactéries – l'effet d'une modification donnée n'est jamais aussi cloisonnée.

En effet, toutes les modifications testées introduisent sur l'électrode des fonctionnalités chimiques électroactives ou non et en changent donc les propriétés physico-chimiques, ce qui influence alors l'affinité des bactéries pour la surface modifiée. Ainsi en tentant de modifier l'électroactivité de l'électrode, on modifie forcément d'autres propriétés, en particulier lorsqu'on introduit des molécules complexes comme les polymères. De même, l'introduction de molécules non électroactives peut influencer le transfert électronique entre la bactérie et l'électrode. En effet, il est probable que les molécules introduites à l'interface biofilm-électrode puissent influencer directement ou indirectement la conformation des protéines telles que les cytochromes membranaires impliqués dans la connexion des bactéries électroactives à l'anode. Or, la conformation des cytochromes a une importance particulière dans l'efficacité du transfert électronique, par exemple en influençant l'orientation des hèmes par rapport à la surface des électrodes (Zhou et al. 2008, Wang et al. 2009, Wang et al. 2012). En effet, plusieurs études sur le transfert électronique entre des cytochromes de type c et des électrodes d'or ont montré que le transfert direct a lieu lorsque l'hème porphyrinique du cytochrome est orienté parallèlement à la surface d'électrode. Au contraire, lorsque cet hème est positionné perpendiculairement à la surface de l'électrode, le transfert direct est ralenti voire inhibé. Ainsi avec une modification dont le but premier est l'amélioration de l'affinité de la surface pour les bactéries, il est possible d'influencer très localement l'orientation des protéines impliqués dans le transport des électrons et alors favoriser ou non le transfert électronique entre les bactéries et les électrodes.

Par ailleurs, plus la molécule introduite en surface est complexe, plus il est difficile de comprendre son influence sur une structure aussi complexe et dynamique qu'une membrane bactérienne. Ainsi, dans le cas de la modification au benzène méthyle triphényle phosphonium décrite précédemment (structure **Figure 4D**), une explication naturelle des meilleures performances du biofilm est l'effet d'attraction électrostatique conféré par le modifiant. Cependant, il est probable que l'effet de la modification ne soit pas attribuable qu'à la charge positive mais à l'ensemble de la fonction triphényle phosphonium, connue pour être capable de pénétrer à l'intérieur de membrane de cellules vivantes (Ross et al. 2005). Il n'est donc pas exclu que cette modification perturbe la structure des membranes des bactéries électroactives de l'interface avec l'électrode et ait une influence globale sur leur métabolisme, par exemple en augmentant l'activité respiratoire des bactéries ou en augmentant l'expression des cytochromes membranaires.

Finalement, les études montrent que l'introduction de molécules spécifiques sur la surface d'électrodes a impact sur les performances des bioanodes. Jusqu'ici pourtant, aucune étude n'a rapporté l'introduction de molécules visant une interaction spécifique avec des molécules constituant les bactéries électroactives. Il semble en effet intéressant de trouver un modifiant capable de se lier ou d'interagir chimiquement avec les bactéries, en particulier avec la membrane externe de ces bactéries puisqu'il s'agit de la structure en contact direct avec l'électrode. J'ai donc voulu tester une telle modification en introduisant des acides boroniques en surface d'électrodes de graphite par réduction de sels d'aryle diazonium fonctionnalisés. Avant de présenter cette étude, il est important d'expliquer la réactivité de cette fonction chimique et le lien possible avec la membrane des bactéries afin de comprendre cette démarche.

1.3 Réactivité des acides boroniques et propriétés des membranes des bactéries

Les acides boroniques sont connus pour se lier de façon spécifique avec des composés chimiques contenant des diols, et en particulier avec des glucides. Les études de cette réactivité des acides boroniques ont été initiées en 1954, grâce à l'hypothèse formulée par Kuivila et al. En ajoutant de l'acide phényle boronique dans une solution saturée de mannitol, les auteurs ont observé la formation d'une nouvelle molécule et ont fait l'hypothèse que ce nouveau composé était un ester boronique cyclique. Par la suite, de nombreuses études ont permis de confirmer cette hypothèse et de caractériser les acides boroniques et leur réactivité vis-à-vis des diols ; l'interaction acide phényle boronique avec les glucides est particulièrement documentée.

Selon Lorand et Edwards (1959), en milieu aqueux, la formation de l'ester entre l'acide boronique et les diols se déroule à pH basique, lorsque l'acide boronique se trouve sous sa forme anionique boronate $R-B(OH)_3^-$. Il s'agit d'une réaction réversible qui a lieu sur des diols en position -1,2 et -1,3, et qui permet de former des ester cycliques de 5 à 6 éléments.

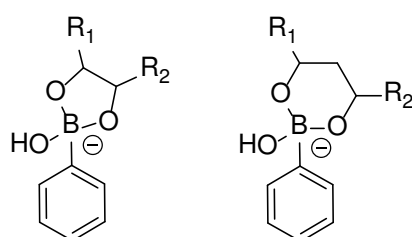


Figure 5 Structures des complexes acide boronique-diols selon Lorand et Edward (1959)

A la suite de ces premières études, il a été longtemps admis que le pH optimal pour la formation de complexes acide boronique-glucide devait être supérieur au pKa de l'acide boronique et que dans l'ester boronique formé, l'atome de bore était majoritairement sous sa forme boronate anionique. Cependant, des études plus récentes (Springsteen et Wang 2002, Yan et al. 2004) ont démontré que le pH optimal de la formation de l'ester dépendait à la fois du pKa de l'acide boronique (gamme étudiée allant d'un pKa de 4 à un pKa de 9) et du pKa de la molécule contenant les diols (gamme étudiée allant d'un pKa de 12 à un pKa de 9). Les mêmes auteurs ont également démontré que la forme neutre de l'ester boronique se formait également en concentrations non négligeables même à pH 7, selon les esters formés. Enfin d'autres études (Nishiyabu et al. 2012) ont montré que les esters boroniques cycliques à 5 éléments formés à partir de diols en position -1,2 étaient plus stables que ceux à 6 éléments formés à partir de diols en position -1,3. La **Figure 6** ci-dessous résume les relations entre les diols et l'acide boronique sous sa forme neutre et sa forme anionique.

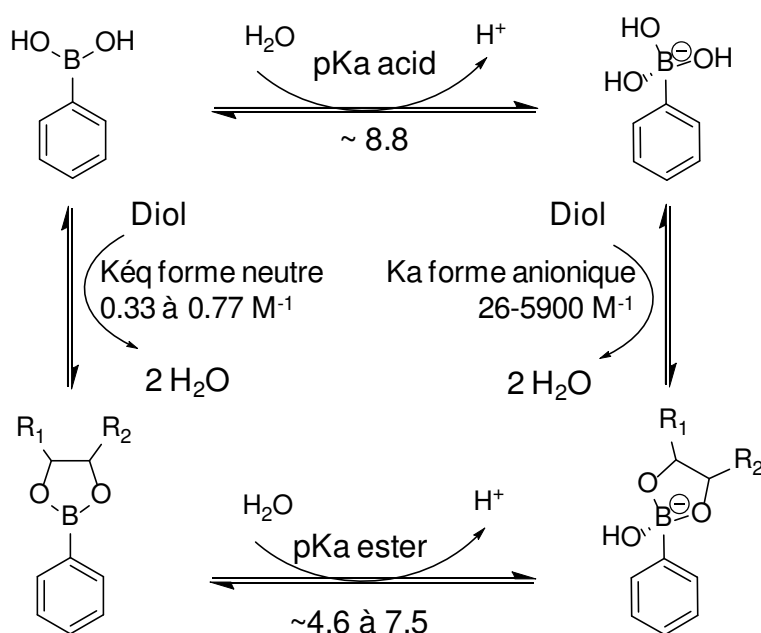


Figure 6 Formation du complexe acide boronique-diol en milieu aqueux. Exemple de l'acide phényle boronique
Les constantes d'association ont été calculées pour différents glucides dans du tampon phosphate 0.01 M pour des pH compris entre 6 et 9 (Yan et al. 2004)

La formation réversible de tels esters a été exploitée dans beaucoup de domaines tels que les techniques de purification et de séparation par chromatographie ou électrophorèse, le développement de biocapteurs pour la détection en milieu aqueux de glucides, glycoprotéines (James et al. 1996, Nishiyabu et al. 2010), ou encore des nucléotides (Elmas et al. 2002, Çamli et al. 2002). Les acides boroniques ont été employés pour la détection de molécules du vivant en

solution, mais aussi pour la détection de microorganismes, notamment des cellules eucaryotes telles que des macrophages et des levures (Polsky et al. 2008, Harper et al. 2007) ou encore des bactéries (Wannapob et al. 2010). En effet, les membranes des microorganismes sont des structures extrêmement complexes susceptibles de contenir des diols dans les sucres des lipopolysaccharide ou des protéines glycosylées.

Cette application des acides boroniques semble particulièrement intéressante dans le cas des biofilms électroactifs microbiens. En effet, la plupart des espèces bactériennes électroactives à l'anode sont connues pour être des bactéries dites Gram négative. Ce type de bactéries se distingue par l'organisation de ses enveloppes externes. En effet les bactéries Gram négatives sont entourées de deux membranes lipidiques : la membrane interne et la membrane externe séparée par le périplasme. Elles sont formées d'une double couche de phospholipides constituant une barrière physique entre l'intérieur et l'extérieur de la bactérie. Les couches de phospholipides sont associées à diverses protéines assurant notamment les échanges avec le milieu extracellulaire ou avec d'autres organismes. Certains lipides de la membrane sont des phospholipides spéciaux, appelé lipopolysaccharides. Ils sont constitués d'une partie lipidique, appelée lipide A et ancrée dans la membrane externe des bactéries et d'une partie polysaccharidique exposée au milieu extracellulaire. La composition de la partie polysaccharidique dépend de l'espèce bactérienne. Certains glucides les plus éloignés de la membrane constituent des antigènes, impliqués dans le signallement intercellulaire et la pathogénicité des microorganismes (Kabanov et Prokhorenko 2009). On attribue la charge globale négative des bactéries Gram négative aux charges portées par les glucides de ces lipopolysaccharides. Dans notre démarche, ces polysaccharides associés à la membrane externe des bactéries électroactives sont intéressants car ils présentent un grand nombre de diols en position -1,2 et -1,3 comme on peut le constater en examinant par exemple la structure d'un modèle de lipopolysaccharide de *Geobacter sulfurreducens* publiée par Vinogradov et al. (2004), schématisé en **Figure 7**.

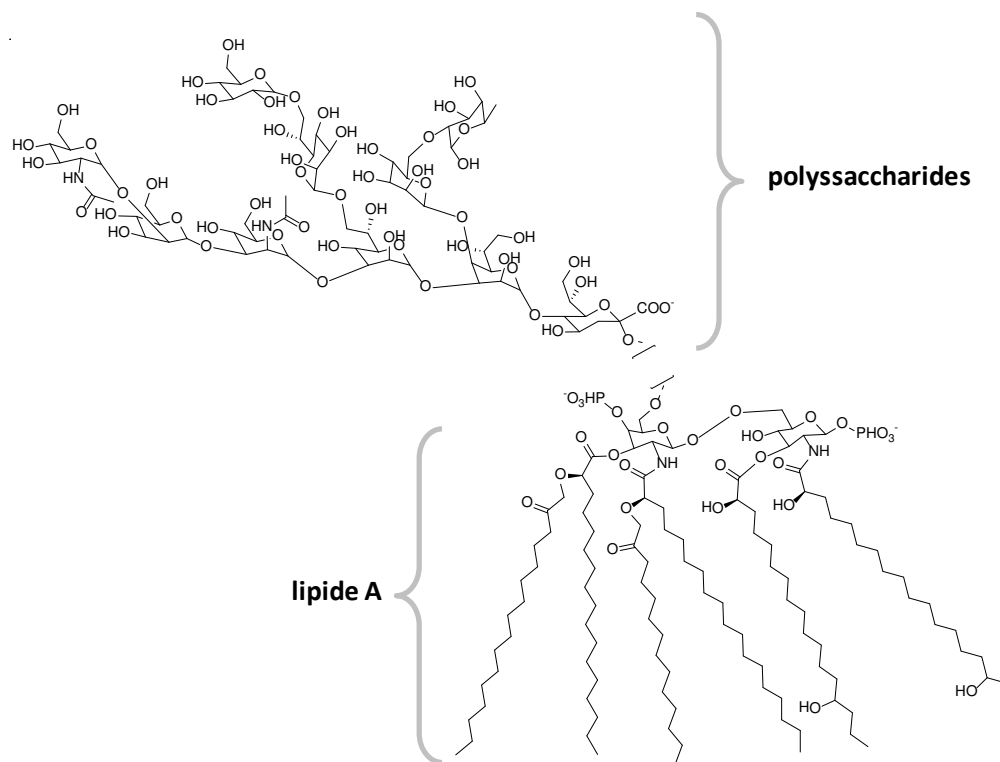


Figure 7 Modèle d'un lipopolysaccharide de *G. sulfurreducens* (à partir de Vinogradov et al. 2004)

Ainsi, on peut émettre l'hypothèse qu'en greffant des acides boroniques à la surface d'électrodes à coloniser, on peut augmenter l'adhésion des bactéries en ciblant les constituants de la membrane externe des bactéries électroactives, comme explicité par la **Figure 8** suivante.

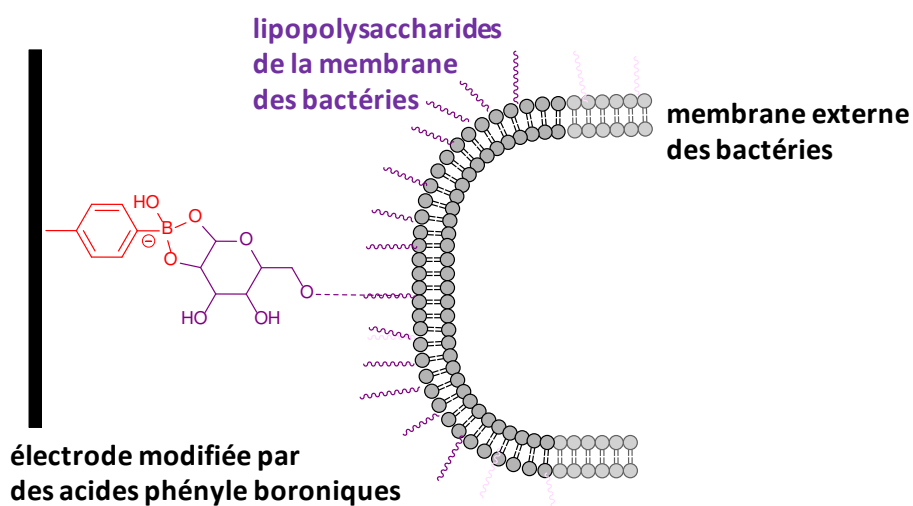


Figure 8 Lien hypothétique entre la membrane externe des bactéries et les acides boroniques greffés sur l'électrode

Cette meilleure adhésion peut aussi avoir des conséquences sur la production et la structure de la matrice d'exopolysaccharides enveloppant le biofilm et qui contient aussi un grand nombre de diols susceptible d'interagir avec les acides boroniques greffés.

Afin de tester ces hypothèses, nous avons choisi de modifier des plaques de graphite avec des acides phényles boroniques et de tester leurs performances en tant qu'anodes associées à un biofilm électroactif dans une pile à combustible microbiologique. La technique de modification choisie est celle du greffage de sels d'aryle diazonium, dont le principe est expliqué ci-après.

1.4 Principe du greffage électrochimique de sels d'aryle diazonium pour modifier les propriétés de surface d'électrodes

Comme nous l'avons vu précédemment, les techniques de modification de surface ne permettent pas toujours de contrôler de façon précise la nature des fonctions chimiques introduites en surface. La technique du greffage électrochimique de sel d'aryle diazonium fait toutefois partie des quelques techniques assurant une fonctionnalisation d'électrode par des molécules choisies et avec un degré de modification contrôlé. Elle est particulièrement employée sur des électrodes de carbone.

Cette technique permet de greffer de façon covalente des groupements phényles et oligophénylènes sur une surface conductrice (**Figure 9**, ci-dessous). De façon pratique, l'électrode à modifier est plongée dans une solution contenant le sel d'aryle diazonium dissous. Un potentiel est appliqué à cette électrode et entraîne alors la réduction du sel en un radical, avec dégagement de diazote. Les radicaux extrêmement réactifs générés à proximité de l'électrode sont alors capables de former une liaison covalente avec la surface de l'électrode. Les radicaux peuvent se greffer sur la surface de l'électrode mais aussi sur les phényles déjà greffés. Cette technique permet donc d'obtenir des degrés de modification variés allant de quelques molécules à des couches multiples de polyphénylène greffées de façon covalente à l'électrode. Cette technique est relativement simple car la modification ne prend que quelques minutes et les sels d'aryle diazonium peuvent être soit isolés soit générés *in situ* dans l'électrolyte à partir de leurs amines correspondantes. Un grand nombre d'aryle amines peut être synthétisé ou sont disponibles commercialement. Selon la fonction chimique souvent portée en *para* par le sel d'aryle diazonium, on peut conférer des propriétés particulières à l'électrode. Ceci constitue un intérêt certain pour nos études car la technique offre la possibilité de moduler de façon extrêmement variée les propriétés de la surface d'électrodes, notamment en y introduisant des acides boroniques.

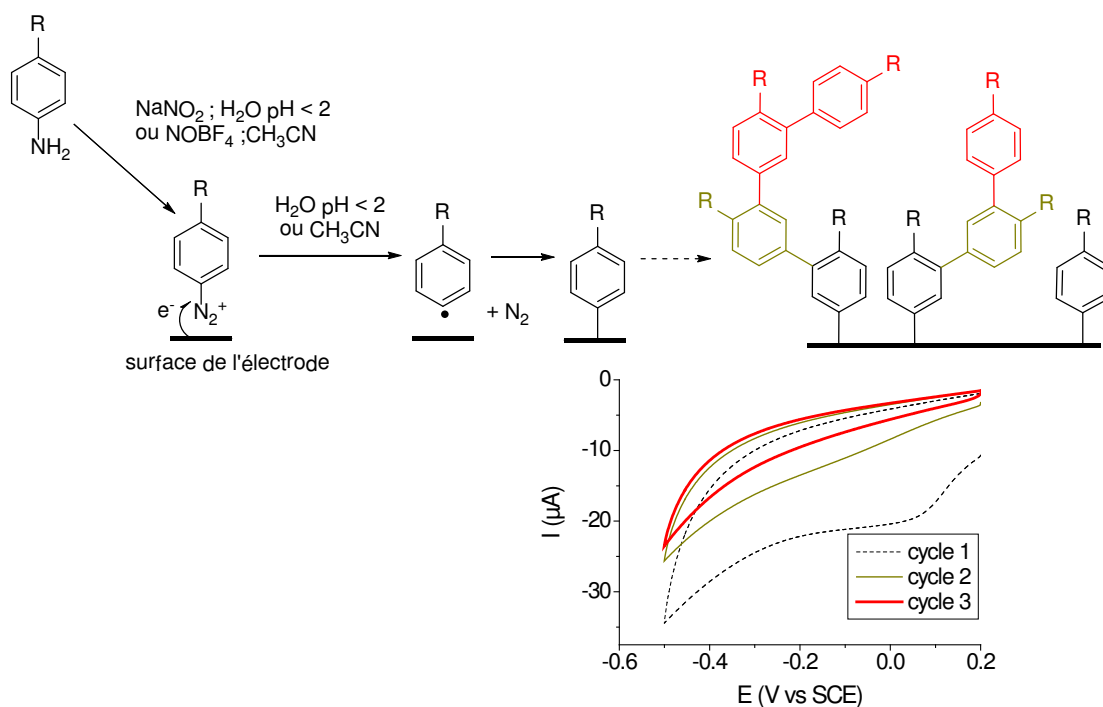


Figure 9 Principe du greffage de sel d'aryle diazonium sur une électrode, utilisant la génération in situ du sel à partir de son amine correspondante et voltamogrammes typiques obtenus

La formation de couches multiples ainsi que l'épaisseur de la couche greffée dépend de la surface, du diazonium utilisé, des conditions de greffage (potentiel appliqué et vitesse de balayage, concentration en diazonium, nombre de balayages) qui influencent la charge consommée pour la réaction de greffage. (Anariba et al. 2003, Kariuki et McDermott. 1999).

La formation de la couche greffée peut aussi être illustrée par les voltamogrammes obtenus lorsqu'on utilise la voltamétrie cyclique pour réduire le diazonium à la surface d'une électrode. Sur le premier balayage, on observe un pic de réduction large, autour de 0 V vs ECS correspondant à la réduction irréversible de l'aryle diazonium en aryle radical. Le potentiel de réduction dépend de la nature de la fonction R. Sur les cycles successifs suivants, on observe une diminution importante du courant de pics car la couche de polyphénylène recouvrant l'électrode rend le transfert électronique interfacial plus difficile, ce qui inhibe peu à peu la réduction des sels d'aryle diazonium en solution. L'épaisseur et la quantité de modifiants introduits sont particulièrement importantes dans le cas d'une utilisation des électrodes modifiées dans des systèmes microbioélectrochimiques, comme il l'a été démontré dans notre étude précédente sur des bioanodes de Piles à Combustible Microbiologiques (Picot et al. 2011). Dans notre étude, des électrodes ont été modifiées avec une couche de polyphénylène amine en utilisant différents degrés de modification. Ce degré de modification peut être contrôlé par la charge consommée lors du greffage électrochimique (Pinson et Podvorica 2005). L'étude a démontré que

l'introduction de fonctions amines par greffage de sels d'aryle diazonium avait un effet bénéfique sur les puissances maximales délivrées par les biofilms électroactifs lorsque le degré de modification était maintenu dans une gamme de modification légère. Dans cette gamme, plus la quantité de modifiants introduits augmente, plus les puissances maximales augmentent. Cependant, lorsque le degré de modification est excessif, on constate une diminution des puissances maximales délivrées et une colonisation moins importante par les bactéries électroactives. Il a été mis en évidence que cette baisse des performances est due au blocage du transfert électronique entre la solution (ou le biofilm) et l'électrode par la couche de polyphénylène greffée sur l'électrode. Cette étude montre qu'il est important de caractériser la surface modifiée avant colonisation par le biofilm en termes de propriétés de transfert électronique. Cette constatation rejoint celle rapportée par Saito et al. (2011) qui montre aussi qu'il existe un degré optimal pour la modification. Cependant, les auteurs ont attribué l'effet négatif d'une modification excessive à la toxicité de la molécule greffée. Cet argument semble discutable car les seuils de toxicité pris en compte sont modérés et ont été calculés sur des organismes pluricellulaires et non sur des bactéries, qui plus est, à partir de la molécule en solution.

Un autre intérêt de l'utilisation du greffage de sels de diazonium est la robustesse de la modification. En effet, du fait de la formation de liaisons covalentes, la modification est capable de résister à un certain nombre de conditions extrêmes telles que la sonication, la présence d'acides ou de bases concentrés ou de solvants agressifs (Pinson et Podvorica 2005). Le seul moyen efficace connu pour éliminer la couche greffée est d'utiliser des moyens mécaniques comme le polissage.

Cette technique de modification a donc été retenue pour l'étude qui fait l'objet de ce chapitre. Dans la partie suivante, nous présenterons les résultats obtenus lorsque des électrodes sont fonctionnalisées avec une couche de polyphénylène portant des acides boroniques. Dans un premier temps, la procédure de fonctionnalisation des électrodes a été mise au point et étudiée, puis les électrodes modifiées ont été introduites à l'anode de piles à combustible microbiologiques.

2 Etude du greffage d'acides boroniques sur des surfaces d'électrode et de leur influence sur les performances d'anodes microbiologiques dans des piles à combustible

2.1 Etude du procédé de fonctionnalisation

2.1.1 Généralités sur le procédé de fonctionnalisation et introduction aux études menées

Le procédé de fonctionnalisation de la surface des électrodes utilisé ici a été étudié et adapté à partir d'une procédure publiée (Polsky et al. 2008) et suivant le schéma général ci-après :

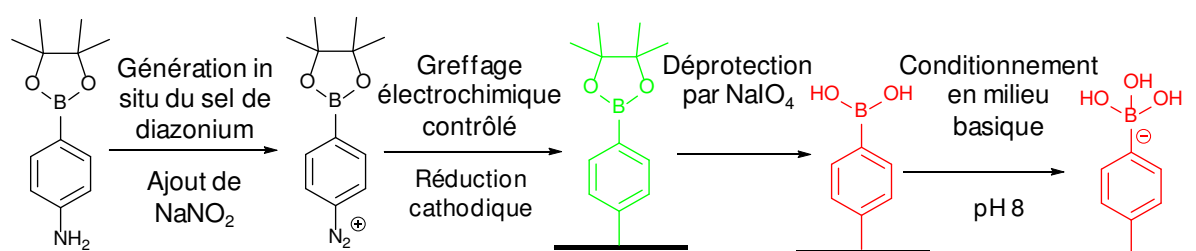


Figure 10 Schéma général du procédé de fonctionnalisation

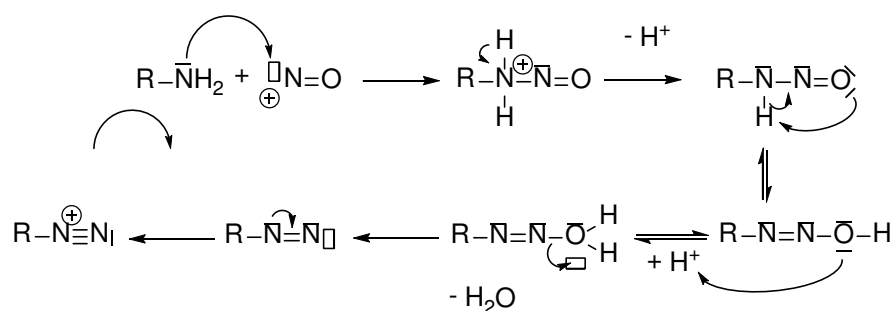
La fonctionnalisation consiste dans un premier temps en un greffage électrochimique de l'acide phényle boronique protégé par un ester pinacol. Le sel d'aryle diazonium peut être synthétisé ou peut être généré juste avant le greffage à partir de l'amine correspondante, l'ester 4-aminophényle boronique pinacol, grâce à l'ajout de nitrite de sodium. La réduction du sel de diazonium permettant le greffage est réalisée par voltamétrie cyclique. La charge consommée durant le greffage est suivie afin de contrôler le degré de modifiant introduit en surface. Le degré de modification est l'un des enjeux principaux de la fonctionnalisation d'électrodes pour le développement des bioanodes. Idéalement, le degré de modification doit introduire suffisamment de fonctions en surface pour observer un effet potentiel sur le biofilm anodique, mais ne doit pas être excessive, ce qui risque de ralentir le transfert électronique à la surface de l'électrode et d'empêcher la connexion du biofilm, comme établi précédemment par notre groupe (Picot et al. 2011).

Dans un second temps, on cherche à éliminer le groupement pinacol protégeant les fonctions acides boroniques greffées. La déprotection est réalisée par trempage des électrodes dans une solution de périodate de sodium, par coupure oxydative du pinacol (Murphy et al. 2007). Ici, l'enjeu est d'obtenir une déprotection la plus complète possible.

2.1.2 Etude du procédé de fonctionnalisation

Choix de la génération *in situ* du sel de diazonium

Isoler le sel d'aryle diazonium permet d'effectuer des greffages avec une concentration de départ en sel de diazonium contrôlée. Cette isolation peut être réalisée par réaction de diazotation de l'amine primaire correspondante avec l'ion nitrosonium NO^+ :



Cependant, les sels d'aryle diazonium peuvent parfois être difficiles à isoler et sont instables. Dans notre cas, nous avons réussi à isoler le sel de diazonium en faisant réagir l'amine correspondante, la 4-aminophényle boronique acide pinacol ester dans l'acétonitrile en

présence de nitrosonium tétrafluoroborate NOBF_4 . Immédiatement après filtration, on obtient un solide blanc mais qui se colore très rapidement malgré l'absence de lumière et une température maintenue autour de 0°C . Le spectre RMN ^1H du produit obtenu quelques minutes après la filtration montre qu'il ne s'agit pas d'un composé pur. Le sel de diazonium y est présent à 77%, ainsi que deux composés secondaires, dont l'amine de départ ce qui montre que la réaction de diazotation n'est pas totale (voir section expérimentale).

La coloration du produit devient de plus en plus prononcée au fil du temps, ce qui suggère une dégradation progressive du sel d'aryle diazonium. Devant la difficulté d'isoler de façon durable le sel d'aryle diazonium, nous avons choisi d'utiliser la méthode de la génération in situ. Bien que la concentration en sels d'aryle diazonium ne soit pas connue précisément, nous contrôlons la quantité de molécules greffées en choisissant la concentration de départ de l'amine et en mesurant la charge consommée durant la réaction de greffage électrochimique.

Etude électrochimique du greffage du sel d'aryle diazonium

Si on envisage une utilisation des électrodes modifiées comme anodes permettant le développement de biofilm anodiques, il est important de contrôler le degré de modification afin de s'assurer que la couche greffée n'empêche pas le transfert des électrons vers l'électrode. D'après nos travaux précédents (Picot et al. 2011), le greffage de phénylamine sur plaques de graphite a un effet positif sur les performances d'un biofilm anodique électroactif, lorsque la charge consommée lors du greffage est comprise entre 16.5 et 28 mC.cm^{-2} ; à partir de 50 à 60 mC.cm^{-2} , on observe que la couche greffée commence à avoir un effet négatif sur les performances du biofilm électroactif.

Afin de vérifier la validité de cet intervalle dans le cas du sel d'aryle diazonium étudié ici, nous avons donc choisi de tester le greffage de l'ester phényle boronique pinacol sur carbone vitreux pour deux degrés de modification différents, l'un à 16 mC.cm^{-2} ce qui correspondrait à une modification légère et l'autre à 48 mC.cm^{-2} ce qui correspondrait à une forte modification.

La modification se fait en milieu aqueux ($\text{HCl } 0.1 \text{ M}$), sous bain de glace et après bullage d'argon dans la solution. Le sel de diazonium est généré à partir de l'ester 4-aminophényle boronique pinacol (10 mM) après ajout de nitrite de sodium (20 mM). Après 60 secondes, on applique une série de balayages de potentiel à l'électrode à greffer, sous la forme de cycles successifs. Les potentiels appliqués permettent la réduction du sel et le greffage covalent à la surface de l'électrode. La charge cathodique consommée par la réaction est intégrée à chaque cycle. Au cours du greffage, on distingue nettement sur le premier voltamogramme, un pic large

de réduction à 0.063 V vs ECS, correspondant à la réduction du sel de diazonium sur la surface de carbone vitreux. Au cours des cycles suivants, les courants diminuent fortement et on distingue à peine le pic de réduction des sels de diazonium car le transfert électronique interfacial est ralenti par les molécules déjà greffées. Cette allure des voltamogrammes enregistrés au cours du greffage électrochimique des sels d'aryle diazonium est largement décrite dans la littérature (Pinson et Podvorica 2005, McCreery 2008, Bélanger et Pinson 2011) et constitue une première indication du bon déroulement du greffage.

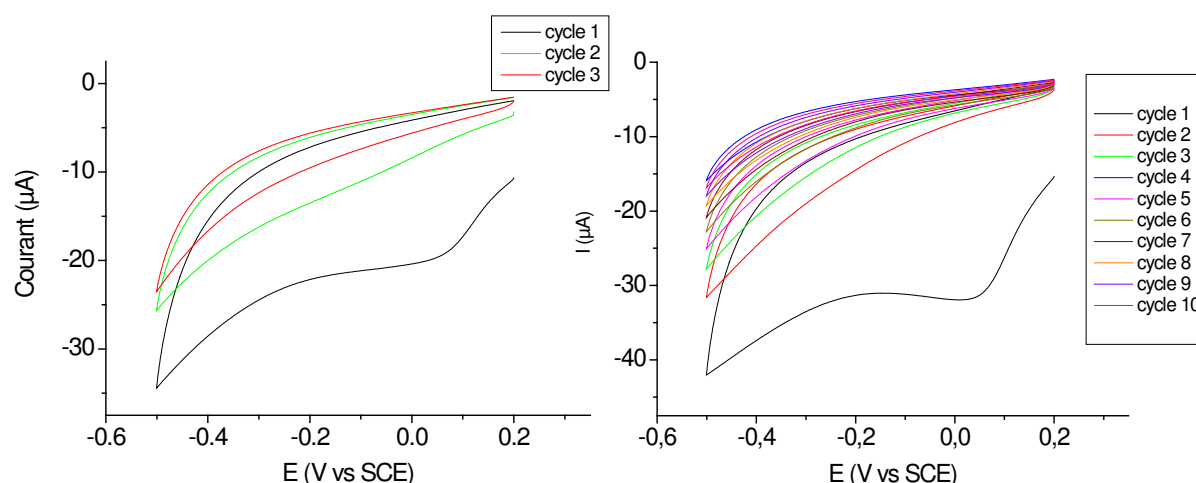


Figure 12 Voltamogrammes obtenus lors du greffage du sel de diazonium généré in situ à partir de l'ester 4 aminophényle boronique pinacol (10 mM) par ajout de NaNO_2 (20 mM) dans HCl 0.1 M. 3 cycles ont été effectués à 0.1V.s^{-1} . A droite, voltamogrammes enregistrés pour une modification légère : 3 cycles correspondant à une charge consommée de 16 mC.cm^{-2} . A gauche, voltamogrammes enregistrés pour une forte modification : 10 cycles correspondant à une charge consommée de 48 mC.cm^{-2}

Le degré de modification a été modulé par le nombre de cycles appliqué. Trois cycles successifs permettent une modification légère ($C = 16\text{ mC.cm}^{-2}$) et 10 cycles permettent une modification plus forte ($C = 48\text{ mC.cm}^{-2}$).

2.1.3 Transfert électronique sur la surface fonctionnalisée

Afin de vérifier l'effet de la modification sur le transfert électronique à la surface de l'électrode, nous avons étudié par voltamétrie cyclique l'oxydoréduction sur l'électrode d'une sonde électrochimique, le ferricyanure de potassium.

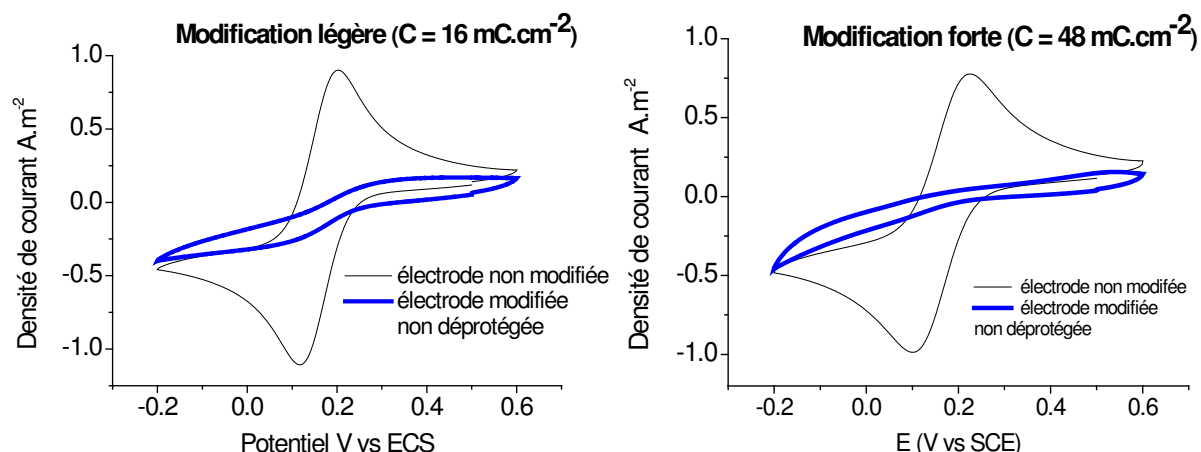


Figure 13 Voltamogramme de l'oxydoréduction du ferricyanure (2 mM dans 0.1 M KCl et 10 mM Tampon Phosphate pH7) sur électrode de carbone vitreux nue (noir) et sur électrode après greffage électrochimique de phényle boronique pinacol ester (bleu), avec degré de modification léger (gauche) et degré de modification fort (droite)

Sur électrode nue, l'écart faible (80 mV) entre le pic de réduction et le pic d'oxydation du ferricyanure témoigne d'un transfert électronique rapide. Après modification, les pics d'oxydoréduction du ferricyanure ne sont plus observables, ce qui indique un ralentissement important voire un blocage du transfert électronique vers la surface modifiée. Contrairement à ce qui avait été décrit par Picot et al (2001), on observe ce ralentissement quelque soit le degré de modification testé. On peut expliquer ce phénomène par la présence du groupement pinacol sur la molécule greffée qui présente un encombrement stérique important et qui est hydrophobe, ce qui peut empêcher l'interaction entre le ferricyanure et la surface de l'électrode.

En effet, après l'étape de déprotection, on observe une amélioration significative du transfert électronique au niveau de l'électrode légèrement modifiée. Cette étape de déprotection consiste à éliminer le groupement pinacol afin d'obtenir les acides phényle boroniques en surface des électrodes. La déprotection est réalisée en laissant réagir les électrodes dans une solution de périodate de sodium NaIO_4 (50 mM de NaIO_4 , une demi heure : procédure de Polsky et al. 2008). Ces premières mesures ont suggéré que les paramètres de réactions publiés dans la littérature n'entraînaient qu'une déprotection partielle des groupements greffés. Nous avons alors choisi d'optimiser cette étape, tout d'abord en utilisant une concentration de 500 mM de NaIO_4 , puis en allongeant le temps de réaction à une nuit entière.

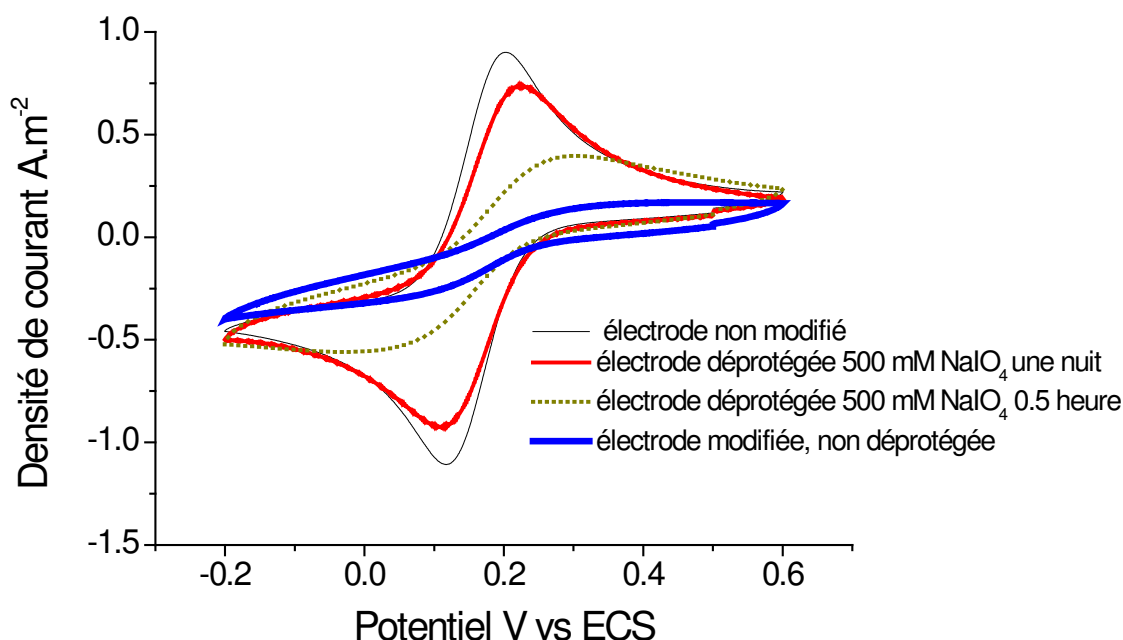


Figure 14 Voltamogramme de l'oxydoréduction du ferricyanure (2 mM dans 0.1 M KCl et 10 mM tampon phosphate pH 7) sur électrode de carbone vitreux nue (noir) et sur électrode après greffage électrochimique de phényle boronique pinacol ester (bleu) avec faible modification ($C=16 \text{ mC.cm}^{-2}$), après déprotection des acides boroniques par 500 mM de NaIO_4 une demi heure (pointillés verts), après déprotection des acides boroniques par 500 mM de NaIO_4 une nuit (rouge)

Après avoir réagi dans 500 mM de NaIO_4 pendant une demi-heure, on distingue à nouveau les pics d'oxydo-réduction du ferricyanure par voltamétrie cyclique sur les électrodes modifiées. Cette observation suggère une récupération partielle de la capacité de l'électrode à transférer les électrons après déprotection qui serait due à l'élimination du groupement pinacol. Par ailleurs, en allongeant le temps de réaction à une nuit entière, les courants de pic d'oxydo-réduction du ferricyanure sur les électrodes modifiées augmentent, jusqu'à être proches des pics observés sur électrodes nues, ce qui suggère une meilleure déprotection lorsque le temps de réaction augmente. Dans le cas de l'électrode fortement modifiée, on observe que même avec une concentration en NaIO_4 de 500 mM et une nuit de réaction, la couche de modifiant continue de bloquer le transfert électronique entre l'électrode et le ferricyanure.

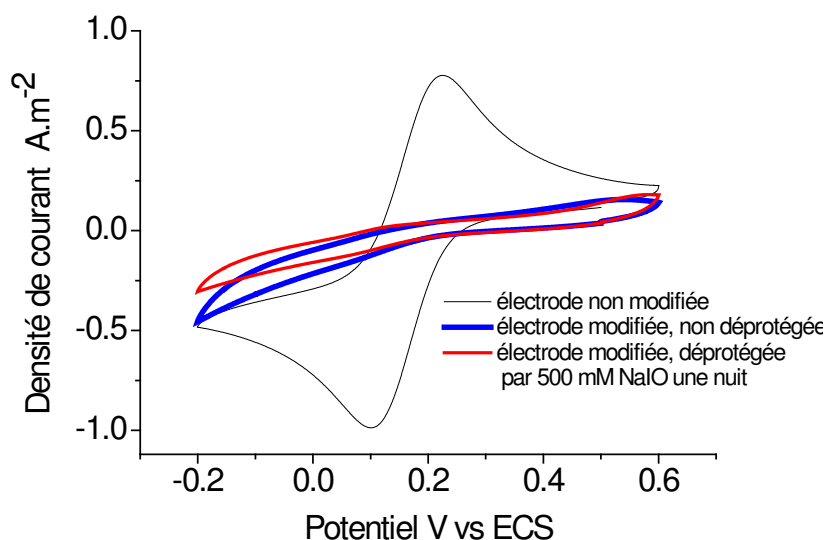


Figure 15 Voltamogramme de l'oxydoréduction du ferricyanure (2 mM dans 0.1 M KCl et 10 mM Tampon Phosphate pH 7) sur électrode de carbone vitreux nue (noir) et sur électrode après greffage électrochimique de phényle boronique pinacol ester (bleu) avec forte modification ($C=48 \text{ mC.cm}^{-2}$), après déprotection des acides boroniques par 500 mM de NaIO_4 pendant une nuit (rouge)

Finalement, après élimination du groupement pinacol, on observe un comportement des couches greffées similaire à ce qui avait été observé pour un autre groupement Ph-NH_2 (Picot et al. 2011). En effet, pour une modification légère, typiquement des charges consommées lors du greffage électrochimique d'une quinzaine de mC.cm^{-2} , le transfert électronique entre l'électrode et le ferricyanure est peu perturbé. En revanche, lorsque le degré de modification est fort, typiquement pour des charges consommées lors du greffage électrochimique supérieures à 50 mC.cm^{-2} , le transfert électronique entre l'électrode et le ferricyanure est très ralenti, voire bloqué.

De plus, nous avons vu que ces mesures de transfert électronique permettent d'évaluer l'efficacité de la déprotection. En effet, elles indiquent que la concentration et le temps de réaction que nous avons utilisé permettaient d'augmenter la déprotection des molécules greffées. Afin de compléter ces mesures électrochimiques, nous avons également réalisé des mesures de spectroscopie infrarouge des couches modifiées sur des électrodes d'oxyde indium-étain (ITO).

2.1.4 Caractérisation des surfaces fonctionnalisées par spectroscopie infrarouge

Nous avons utilisé la spectroscopie infrarouge afin de vérifier les fonctionnalités chimiques présentes en surface des électrodes au cours du processus de fonctionnalisation. Cette spectroscopie repose sur la capacité des molécules à absorber des ondes électromagnétiques à des longueurs d'ondes précises. Dans l'infrarouge moyen, c'est-à-dire pour des longueurs

d'ondes comprises approximativement entre 400 et 4000 cm^{-1} , les ondes entraînent des mouvements vibratoires des molécules à des longueurs d'ondes dépendant de la nature de fonctions chimiques. L'analyse de la lumière absorbée ou transmise par la surface à analyser suite au passage d'un faisceau de lumière infrarouge, permet de mesurer la quantité d'énergie absorbée à chaque longueur d'onde et de connaître ainsi la nature des fonctions chimiques présentes sur les surfaces fonctionnalisées. Nous avons choisi d'étudier notre procédé de fonctionnalisation sur des plaques d'ITO car les mesures sur matériaux carbonés n'ont pas donné de résultats interprétables, probablement à cause de la friabilité du graphite sur le spectromètre infrarouge. De plus, pour cette étude de spectroscopie infrarouge, il est important d'avoir un grand nombre de fonctions greffées en surface, afin de pouvoir détecter au mieux les molécules. Ainsi, les plaques d'ITO ont subi un greffage électrochimique important, jusqu'à blocage électrochimique de la surface. Les spectres obtenus avant et après déprotection sont présentés ci-après.

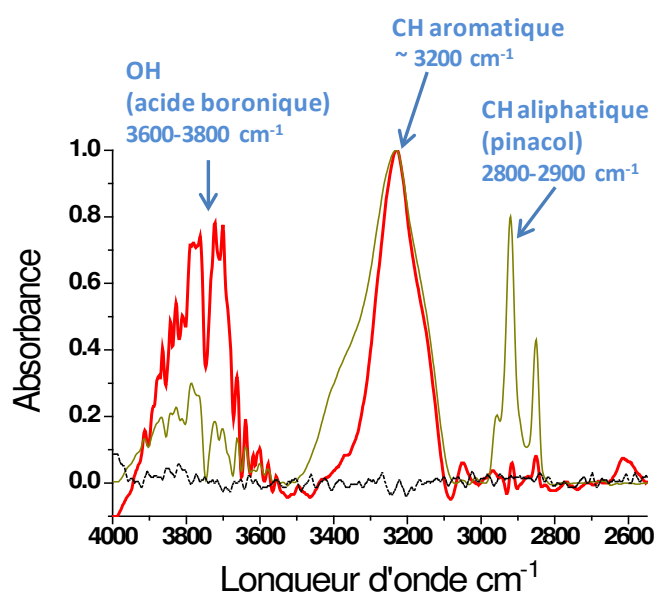


Figure 16 Spectres IR de la plaque d'ITO non modifiée (pointillés noirs), de la plaque modifiée non déprotégée (vert), de la plaque modifiée et déprotégée par 500mM NaIO_4 (rouge). Encart : zoom sur les spectres entre 4000 et 2600 cm^{-1} : les spectres avant et après déprotection ont été normalisés par rapport à l'intensité de la bande à 3200 cm^{-1} attribuée aux vibrations C-H aromatique des phényles greffés.

L'attribution des bandes a été réalisée en comparant les spectres avec i) ceux des produits commerciaux non greffés, le phényle boronique pinacol ester et l'acide phényle boronique ainsi que ii) ceux des plaques modifiées par greffage électrochimique de phényles et de 4-méthylphényles (cf section expérimentale). La comparaison des spectres avant et après déprotection a été effectuée sur des bandes situées entre 4000 et 2700 cm^{-1} (**Figure 16**) et confirme ce que nous avons déduit de l'évaluation du transfert électronique entre le

ferricyanure et les surfaces modifiées. En effet, avant déprotection, on observe un ensemble de bandes entre 2800 et 2900 cm^{-1} attribuées aux vibrations d'élongation des C-H aliphatiques des groupements $-\text{CH}_3$ du pinacol. Après déprotection (500 mM NaIO_4 , une nuit), on observe la disparition des bandes attribuées au groupement pinacol et on observe l'apparition d'un ensemble large de bandes entre 3600 et 3800 cm^{-1} , attribuées aux vibrations O-H du groupement $\text{B}(\text{OH})_2$. Ces deux observations sont en accord avec une déprotection efficace des acides boroniques présents sur la surface de la plaque d'ITO. Enfin, avant et après déprotection, on observe une même bande large centrée autour de 3200 cm^{-1} attribuée aux vibrations des C-H aromatiques des polyphénylènes greffés.

Sur la surface d'ITO modifiée avec les acides phényle boroniques non déprotégés par le périodate de sodium, on peut aussi noter la présence à faible intensité de l'ensemble de bandes entre 3600 et 3800 cm^{-1} que l'on a attribué aux fonctions acides boroniques $\text{B}(\text{OH})_2$. Ces bandes indiquent qu'une partie des acides boroniques aurait été déprotégée avant la mise en contact avec le périodate de sodium. Ce phénomène a déjà été décrit précédemment (Polsky et al 2008). Il s'agit d'une hydrolyse spontanée des groupements pinacol qui a pour conséquence la déprotection non contrôlée d'une partie des acides boroniques après le greffage électrochimique des acides phényle boroniques pinacol ester sur la surface d'électrode. De plus, lorsqu'on diminue le temps de la réaction de déprotection, on observe une baisse d'intensité et non une disparition des bandes entre 2800 et 2900 cm^{-1} attribuées $-\text{CH}_3$ au pinacol, comme indiqué par le spectre obtenu (**Figure 17** pointillés bleus) pour un temps de réaction d'une demi-heure des électrodes dans 500 mM de pinacol.

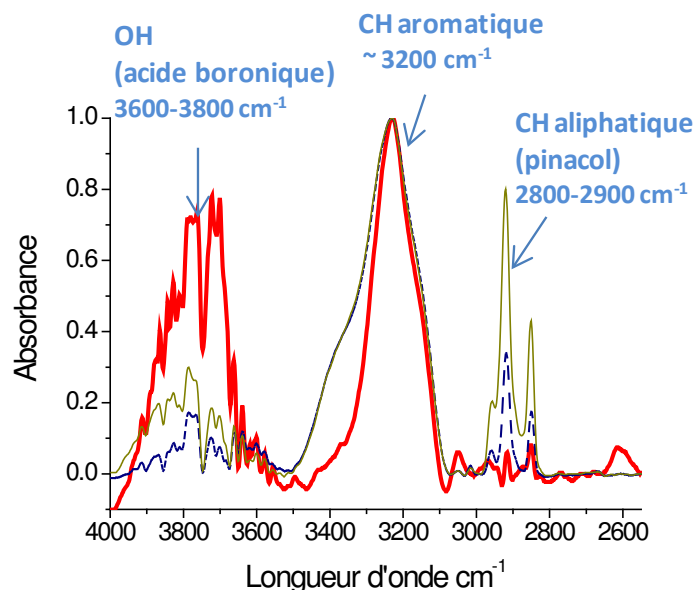


Figure 17 Spectres Infra Rouge d'une plaque modifiée non déprotégée (vert), d'une plaque modifiée et déprotégée par 500mM NaIO₄ pendant une demi-heure (pointillés bleus) et d'une plaque modifiée et déprotégée par 500mM NaIO₄ pendant une nuit (rouge)

Ce spectre indique que pour ce temps plus court de réaction, la déprotection des acides boroniques de la surface n'est que partielle, car on détecte toujours la fonction pinacol sur la surface. Ces résultats corroborent ce qui avait été déduit des voltamogrammes de l'oxydo-réduction du ferricyanure sur les surfaces modifiées.

2.1.5 Conclusion de la partie 2.1

L'ensemble des mesures d'électrochimie et de spectroscopie infrarouge mettent en évidence que la procédure de fonctionnalisation mise au point au cours de ce travail de thèse permet de greffer de façon covalente des acides phényles boroniques sur des surfaces d'électrodes sans ralentir de façon excessive les cinétiques de transfert d'électrons entre une sonde électrochimique, le ferricyanure de potassium et l'électrode. Cette sonde particulière a été utilisée car elle a démontré lors d'une étude précédente (Picot et al. 2011) que son comportement est en cohérence avec le transfert électronique entre un biofilm électroactif et une anode. Cette procédure a donc été appliquée pour modifier des plaques de graphite de plusieurs dizaines de cm², utilisées par la suite comme bioanodes microbiennes.

2.2 Influence des acides boroniques greffés à l'anode sur le temps de latence, la catalyse des réactions d'oxydation et la puissance délivrée

Avant introduction à l'anode d'une pile à combustible microbiologique, l'électrode fonctionnalisée est conditionnée à pH 8, afin d'obtenir la forme boronate en surface d'électrode. En effet, la formation du complexe acide boronique - glucide se fait majoritairement lorsque l'acide boronique est sous sa forme boronate. L'électrode fonctionnalisée est ensuite introduite à l'anode d'une pile à combustible microbiologique, et mise en contact avec un inoculum riche en bactéries électroactives (mélange de bactéries provenant d'anolytes précédemment étudiés et de cultures pures de *Geobacter sulfurreducens*). La configuration des piles utilisée est la même que celle décrite dans le Chapitre 2. L'anode est reliée à la cathode par une résistance de 1 k Ω . Afin de se concentrer sur les phénomènes anodiques, on choisit de travailler avec une cathode non limitante réduisant le ferricyanure (0.1 M).

Afin de comprendre l'effet des acides boroniques sur les performances des bioanodes, les anodes fonctionnalisées avec les acides phényle boroniques sont comparées à deux anodes contrôles : une anode non modifiée et une anode modifiée avec les esters phényle boroniques pinacol, non déprotégés, ce qui constitue un jeu expérimental de 3 piles, comme schématisé ci-dessous.

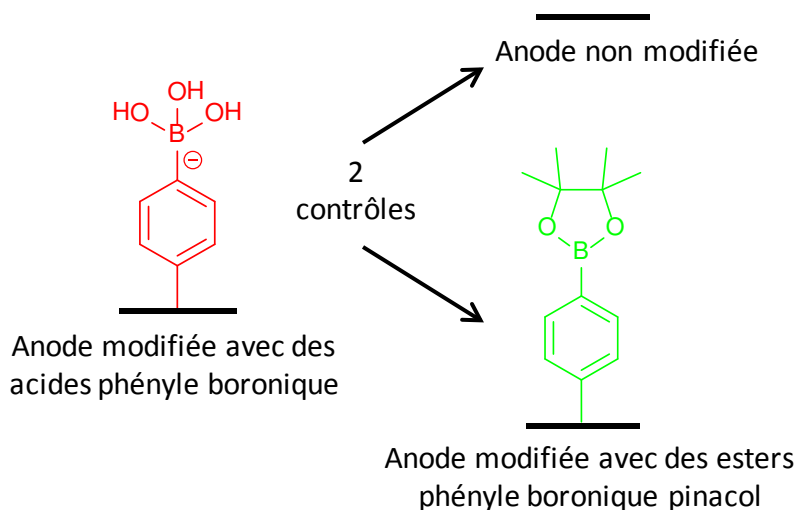


Figure 18 Schéma du premier jeu expérimental présentés

Nous commencerons par présenter les résultats obtenus avec un jeu de 3 piles, en termes de temps de développement des biofilms électroactifs, de puissances délivrées par les piles et de courant lié à la catalyse bactérienne de l'oxydation de l'acétate mesuré par voltamétrie cyclique

à faible vitesse de balayage (1 mV.s^{-1}). Puis nous discuterons de la reproductibilité des résultats en présentant les mesures obtenues avec deux autres jeux expérimentaux étudiés successivement.

2.2.1 Temps de formation du biofilm anodique

Le développement d'un biofilm anodique bactérien peut être mesuré par le courant délivré par la pile suite à sa mise en place. Les réactions cathodiques non limitantes pour les 3 piles permettent d'attribuer les différences de courant à la connexion des bactéries électroactives sur les électrodes.

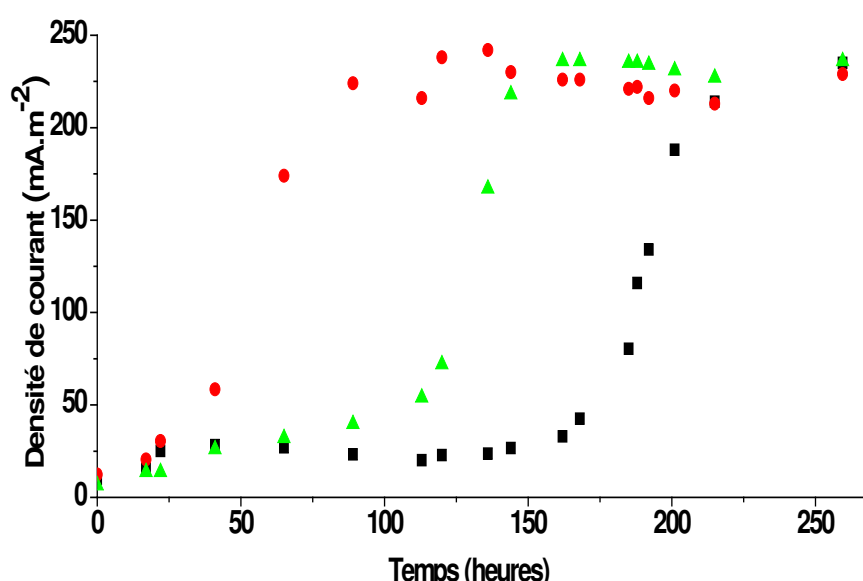


Figure 19 Courants délivrés par les piles du jeu expérimental après leur mise en place. Anodes modifiées par des acides phényle boroniques (ronds rouges) ; Anodes modifiées par des acides phényle boroniques pinacol esters (acides boroniques toujours protégés) (triangles verts) ; anodes non modifiées (carrés noirs)

Dans le cas des deux électrodes contrôles, on observe les phénomènes classiques liés à la mise en place d'un biofilm électroactif. On observe un temps de latence de plusieurs jours, durant lesquels le courant délivré est faible et n'augmente pas ; puis on assiste à une augmentation exponentielle du courant délivré correspondant à la connexion et au développement en surface des bactéries électroactives ; enfin le courant atteint un plateau, correspondant à la formation du biofilm mature sur l'électrode. Pour l'anode non modifiée, le courant délivré reste très bas durant plus de 150 heures, avant d'augmenter de façon exponentielle jusqu'à un plateau. Pour l'anode modifiée avec les esters phényle boroniques pinacol (acides boroniques protégés), l'augmentation exponentielle du courant débute après plus de 120 heures.

En revanche, pour l'anode modifiée avec des acides phényle boroniques, le courant augmente immédiatement après la mise en place de la pile et atteint un plateau alors même que les deux bioanodes contrôles sont encore en phase de latence. Le biofilm électroactif s'établit et se connecte donc plus rapidement sur l'électrode comportant des acides phényle boroniques que sur les deux électrodes contrôles. Cette observation semble alors en accord avec une interaction spécifique entre les lipopolysaccharides de la membrane externe des bactéries électroactives et les acides phényle boroniques greffés sur l'électrode.

On note aussi que le biofilm électroactif se développe plus vite sur l'électrode modifiée avec des acides phényle boroniques pinacol ester que sur électrode de graphite non modifiée, ce qui peut sembler contradictoire avec la caractérisation électrochimique des surfaces grâce au ferricyanure présentée précédemment, montrant un transfert électronique ralenti sur ces dernière électrodes avant la déprotection. Cependant, les données de spectroscopie infra rouge font ressortir la présence possible d'acides boroniques déprotégés spontanément sur cette surface, ce qui expliquerait le développement un peu plus rapide des biofilm sur cette anode modifiée.

Une fois les biofilms développés sur les 3 anodes étudiées, l'anolyte des piles est remplacé par un anolyte neuf, comportant une quantité non limitante d'acétate afin d'étudier les performances des 3 bioanodes dans un nouveau batch.

2.2.2 Puissances délivrées par les piles à combustible microbiologiques

Une manière classique d'évaluer les performances électriques d'une pile est de réaliser des courbes de polarisation, consistant à mesurer le courant délivré par la pile pour une série de plusieurs différences de potentiel imposées. De ces courbes, il est possible de mesurer la puissance maximale que peut délivrer la pile. Nous avons effectué ces mesures sur plusieurs cycles batchs pour les trois piles étudiées. L'intérêt d'effectuer les mesures sur plusieurs batchs successifs et de pouvoir suivre l'évolution des performances dans le temps. Nous avons observé qu'à partir du troisième batch effectué, les performances des piles étaient stables d'un batch à l'autre. Une courbe de puissance typique est présentée ci-après.

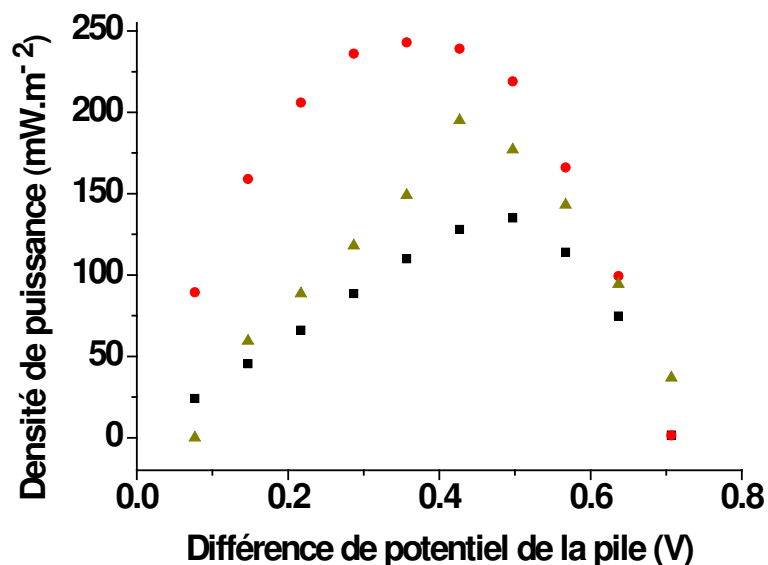


Figure 20 Courbes de puissance typiques enregistrées sur les bioanodes étudiées : anode en graphite non modifié (carrés noirs), anode modifiée par des esters phényle boroniques pinacol (triangles verts) et anode modifiée par des acides phényle boroniques (ronds rouges)

Les différences entre les trois anodes observées lors de la formation des biofilms persistent lorsque les biofilms sont matures. En effet, les biofilms développés sur l'anode modifiée par les acides phényle boroniques délivrent des puissances maximales plus élevées que les deux contrôles. Ainsi, pour la pile utilisant l'anode modifiée par les acides phényle boroniques, on mesure une puissance maximale de près de 250 mW.m^{-2} contre moins de 200 mW.m^{-2} pour la pile utilisant l'anode modifiée avec les acides boroniques toujours protégés et moins de 150 mW.m^{-2} pour celle utilisant une anode de graphite non modifiée. Les cathodes au ferricyanure étant régulièrement remplacées et contrôlées afin de s'assurer qu'elles ne sont pas limitantes, les différences de puissance constatées sont attribuables aux performances des bioanodes. Les fonctions acides boroniques permettent le développement d'un biofilm anodique plus performant en termes de puissances maximales. On note que les différences entre les deux anodes contrôles sont toujours constatées. L'hypothèse d'une déprotection spontanée de quelques acides boroniques permet encore d'expliquer ces observations.

2.2.3 Catalyse de la réaction d'oxydation de l'acétate par le biofilm anodique

La catalyse de l'oxydation de l'acétate par le biofilm anodique peut être mesurée en effectuant de la voltamétrie cyclique à faible vitesse de balayage sur la bioanode, dans son anolyte et en présence d'acétate. L'électrode de travail est la bioanode, une électrode de

référence, l'électrode au Calomel Saturé (ECS), est plongée dans l'anolyte et la cathode est utilisée comme contre électrode.

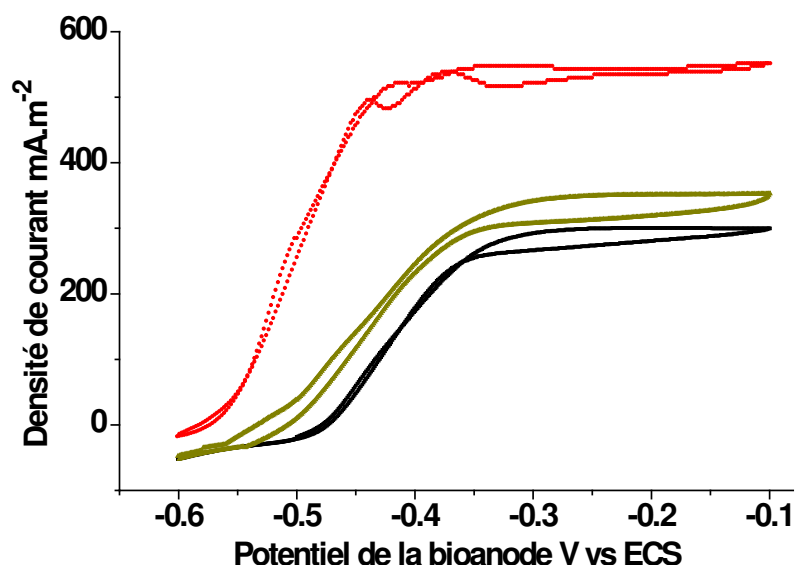


Figure 21 Courants catalytiques mesurés par voltamétrie cyclique et dus à l'oxydation de l'acétate par les biofilms électroactifs établis sur une anode modifiée avec des acides phényles boroniques (ronds rouges), sur une anode modifiée avec des ester phényle boroniques pinacol(vert), sur des anodes de graphite non modifié (noir). Voltammogrammes enregistrés à 1mV.s^{-1} , pour une concentration non limitante en acétate (40 mM)

On observe des voltammogrammes de forme sigmoïdale, typique d'une catalyse d'oxydation à l'anode. A partir de ces voltammogrammes, il est possible de mesurer le courant stationnaire dû à la catalyse de l'oxydation de l'acétate par le biofilm microbien, en prenant la valeur du courant sur le plateau formé par les voltammogrammes ; ici, le courant catalytique est mesuré à -0.1 V vs ECS .

Le courant catalytique dû à l'oxydation de l'acétate par le biofilm établi sur l'anode modifiée avec des acides phényles boroniques est de 500 mA.m^{-2} ce qui est environ 1.7 fois plus élevé que les courants mesurés pour les deux bioanodes contrôles. Ces courants plus importants délivrés par le biofilm développé sur les acides phényle boroniques suggèrent que le transfert électronique vers cette électrode modifiée est meilleur que sur les deux contrôles. De plus, on observe que l'oxydation de l'acétate débute à un potentiel plus bas, à environ -0.57 V vs ECS , que les deux bioanodes contrôles, pour lesquelles l'oxydation de l'acétate débute entre -0.55 V et -0.5 V vs SCE . Ces observations suggèrent que la modification de surface privilégierait des voies de transfert électronique du biofilm vers l'électrode différentes et plus efficaces que celles empruntées avec l'anode non modifié. En effet, il semble que sur l'anode modifiée avec les acides phényle boroniques, le transfert électronique interfacial est réalisé à partir d'une molécule électroactive ayant un potentiel plus bas que celle impliquée sur l'anode non modifiée.

Dans le cas de l'anode modifiée avec les acides phényle boroniques pinacol ester, nos résultats suggèrent fortement qu'une partie des bactéries du biofilm sont en contact avec des acides boroniques déprotégées de façon non contrôlée tandis que d'autres bactéries sont développées sur les molécules toujours protégées par le pinacol ester. Les voltamogrammes enregistrés sur cette électrode sont en accord avec cette hypothèse puisqu'on constate que le potentiel auquel débute l'oxydation de l'acétate par le biofilm est intermédiaire entre l'électrode de graphite non modifié et l'électrode modifiée par des acides phényle boroniques. On observe donc, de nouveau, des performances légèrement meilleures pour la bioanode développée sur l'anode modifiée avec des esters phényle boroniques pinacol (acides boroniques protégés) par rapport à la bioanode développée sur graphite non modifié.

La présence de fonctions acides boroniques permettrait la croissance d'un biofilm catalysant l'oxydation de l'acétate de façon plus efficace que des biofilms développés sur graphite non modifié. Ces résultats posent la question de savoir si les différences de performances sont dues au nombre de bactéries connectées aux électrodes ou à la qualité de la connexion de ces bactéries sur les électrodes. Un moyen d'avancer dans la compréhension des phénomènes est d'étudier le signal des protéines bactériennes membranaires électroactives de type cytochromes, assurant le transfert des électrons entre le biofilm et l'électrode. Cette étude peut être faite par voltamétrie cyclique, mais en absence d'acétate. Nous avons comparé les signaux des biofilms développés sur une anode modifiée avec des acides phényle boroniques avec ceux d'un biofilm développé sur une anode de graphite non modifiée.

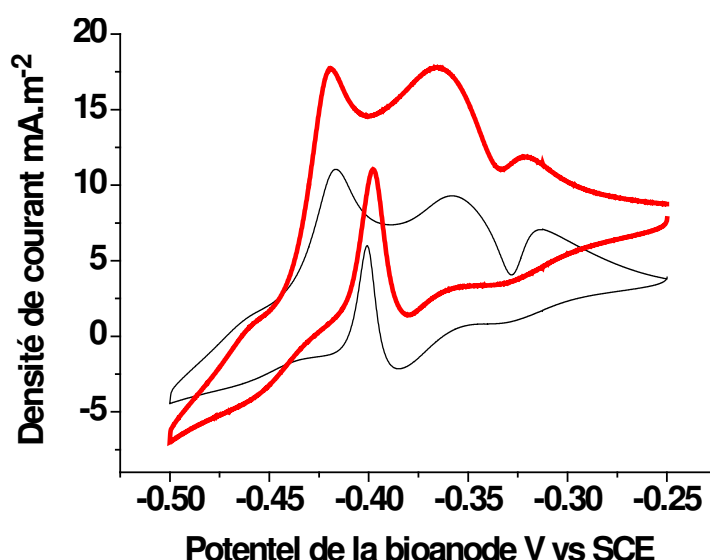


Figure 22 Voltamétries cycliques en absence d'acétate réalisée pour la bioanode modifiée avec des acides phényles boroniques (— rouge) et pour la bioanode développée sur graphite non modifié (— noir)

L'allure des voltamogrammes enregistrés est sensiblement identique sur les deux bioanodes. Il ne semble pas y avoir une voie de transfert des électrons différente lorsque le biofilm se développe sur l'anode modifiée avec les acides phényle boroniques. En revanche, on observe que les courants sont plus importants avec le biofilm développé sur l'anode modifiée avec les acides phényle boroniques par rapport au biofilm développé sur graphite non modifié. Or, dans le cas où l'acétate est absent, le courant mesuré est lié à la quantité de molécules électroactives connectant le biofilm électroactif à l'anode. Il nous apparaît donc qu'il y a plus de molécules électroactives bactériennes sur les bioanodes modifiées avec les acides phényle boroniques que sur les bioanodes non modifiées. Ces molécules électroactives que l'on détecte par voltamétrie cyclique peuvent être des cytochromes liés à la membrane externe des bactéries ou des cytochromes liés à la matrice d'exopolymères liant les bactéries du biofilm entre elles. La plus grande abondance de cytochromes détectés au niveau de la bioanode modifiée avec des acides phényle boroniques peut venir du fait qu'un plus grand nombre de bactéries électroactives soit présent sur l'anode par rapport à l'anode en graphite non modifié. On peut aussi imaginer qu'il y ait le même nombre de bactéries sur les 2 électrodes mais que les bactéries attachées à l'anode modifiée par des acides phényle boroniques expriment de façon plus importante des cytochromes membranaires ou sont connectés de façon plus efficace.

Des images de Microscopie Electronique à Balayage des bioanodes développées sur graphite nu et sur anode modifiée avec des acides phényle boroniques apporte des éléments pour répondre à ces interrogations et permet d'avancer dans la compréhension de l'effet de cette fonctionnalisation sur les biofilms électroactifs bactériens.

2.2.4 Aspect des biofilms microbiens

Nous avons choisi la Microscopie Electronique à Balayage afin d'obtenir des images des biofilms développés sur une anode modifiée par les acides phényle boronique et sur une anode de graphite non modifiée. Des images en coupe des biofilms a permis d'évaluer l'épaisseur des biofilms formés sur les deux surfaces (**Figure 23**, ci-dessous)

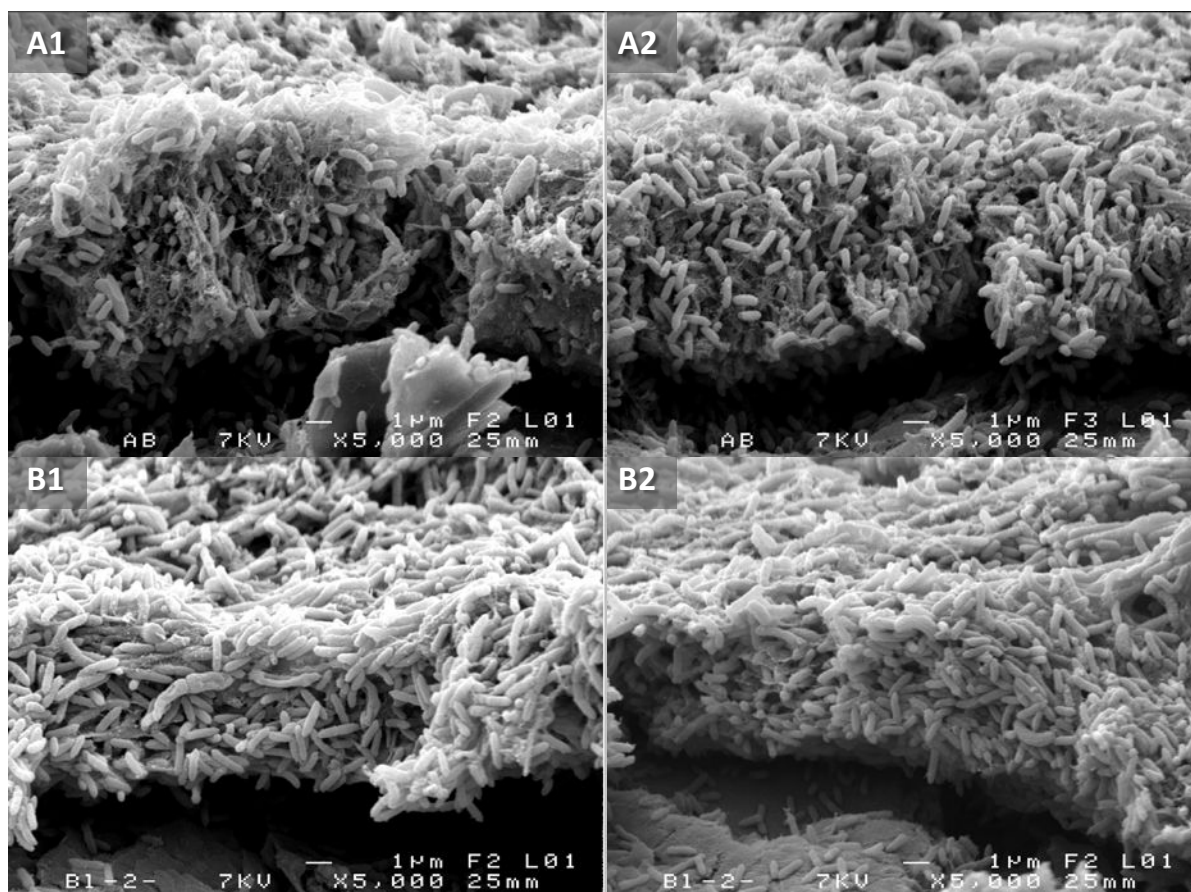


Figure 23 Images MEB d'un biofilm développé sur anode modifiée par des acides phényle boroniques (A1 : prise de vue d'une partie épaisse du biofilm ; A2 : prise de vue d'une partie du biofilm plus fine) et d'un biofilm développé sur graphite non modifié (B1 : prise de vue d'une partie épaisse du biofilm ; B2 : prise de vue d'une partie du biofilm plus fine). Vue en coupe, grossissement x 5000.

Le biofilm établi sur l'anode modifié par des acides phényle boroniques est légèrement plus épais (de 7 à 9 μm environ) que le biofilm développé sur graphite non modifié (5 à 7 μm environ). Cette observation vient étayer l'hypothèse que la fonctionnalisation de l'anode entraîne de meilleures performances car elle permettrait l'attachement de plus de bactéries que l'anode.

Au delà de l'épaisseur, on peut noter que l'aspect général des deux biofilms est différent. Le biofilm développé sur l'anode de graphite non modifié paraît plus tassé que le biofilm développé sur l'anode modifiée par des acides phényle boroniques. Sur graphite non modifié, on observe une orientation des bactéries majoritairement parallèle à la surface d'électrode alors que sur l'anode modifiée avec des acides phényle boroniques, les bactéries s'orientent plutôt perpendiculairement à la surface. Ces différences d'orientation de bactéries sur une surface ont déjà été signalées dans la littérature. Par exemple, une étude de Rzhapishevska et al. (2013) sur la capacité de *Pseudomonas aeruginosa* à former des biofilms a montré que sur certaines

surfaces chargées négativement, les bactéries pouvaient s'orienter de façon perpendiculaire sur une surface afin de minimiser le contact avec les charges répulsives de la surface. D'autres études (Jacinta et al. 2011, Pidhatika et al. 2010) montrent que cette capacité à s'orienter de façon perpendiculaire sur la surface est liée à la présence d'appendices, notamment des pili, chez *P. aeruginosas*. Selon, Jacinta et al. Cette orientation permet le détachement rapide et donc une forte mobilité des bactéries au sein du biofilm.

Enfin, une troisième différence observée dans les biofilms concerne la production d'exopolysaccharides. Sur les vues en coupe détaillées ci-dessus, on observe très peu d'exopolymère entourant les bactéries du biofilm développé sur graphite non modifié. Sur l'anode modifiée avec des acides phényle boroniques, au contraire, il est possible de distinguer la présence de la matrice d'exopolymères cimentant les bactéries entre elles. Cette différence de matrice des biofilms est plus flagrante lorsqu'on observe les biofilms en vue de dessus, avec une prise de vue large (voir **Figure 24** ci-dessous).

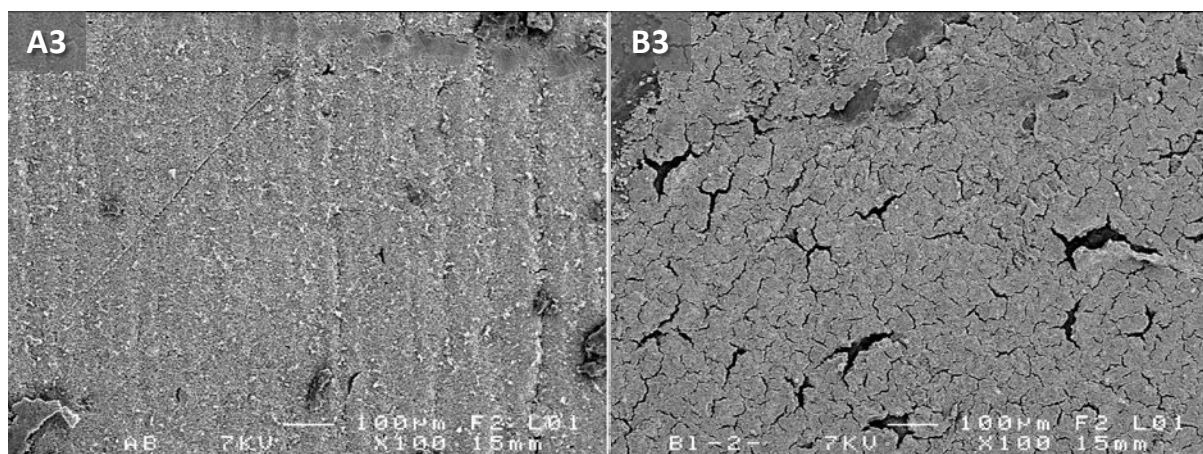


Figure 24 Images MEB d'un biofilm développé sur anode modifiée par des acides phényle boroniques (A3) et d'un biofilm développé sur graphite non modifié (B3). Prise de vue large du dessus des biofilms, grossissement x 100

Sur l'anode modifiée par les acides phényle boroniques, le biofilm a un aspect uniforme et continu alors que sur l'anode de graphite non modifié, le biofilm présente des crevasses et des craquelures. Ces craquelures ne sont pas présentes *in situ* sur la bioanode en fonctionnement. Elles sont dues à la procédure de préparation des échantillons avant observation MEB qui requiert l'assèchement des structures microbiologiques vivantes. Les procédures de préparation des échantillons ayant été identiques et exécutées en même temps pour les deux biofilms, la présence de craquelures sur le biofilm développé sur graphite non modifié est bien due à une différence dans la nature de la matrice d'exopolymères produites par les bactéries et dans sa capacité à retenir l'eau. Il est intéressant de noter que selon les études de Lee et al. (2007) sur

Pseudomonas aeruginosa, il existe un lien entre l'expression des pili permettant l'orientation des bactéries sur une surface et la production de certains exopolysaccharides de la matrice. En effet, ces deux phénomènes seraient liés par un même nucléotide régulateur, le bis-(3',5')-cyclic-dimeric-guanosine monophosphate ou c-di-GMP. (structure, **Figure 25** ci dessous)

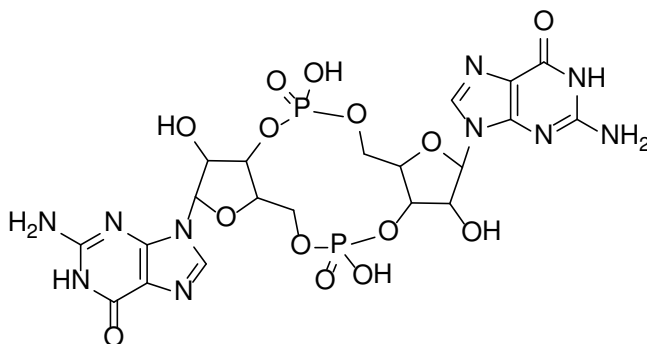


Figure 25 Structure du dinucléotide régulateur c-di-GMP

2.2.5 Reproductibilité des résultats

A la suite de ce premier jeu expérimental, nous avons étudié deux autres jeux expérimentaux afin de déterminer à quel point ces résultats étaient reproductibles. Pour ces deux jeux étudiés, les anodes ont été modifiées avec le même protocole expérimental que précédemment et les procédures de mise en place dans les piles ont été identiques. L'étude de ces deux autres jeux expérimentaux montrent que l'effet des acides boroniques greffés est bien reproductible car on constate toujours la même tendance : les biofilms se développent plus rapidement et présentent de meilleures performances sur les acides boroniques que sur graphite non modifié ou sur acides boroniques protégés.

On observe cependant des différences quantitatives entre les piles des jeux expérimentaux étudiés. On peut expliquer ces différences par le fait que les jeux expérimentaux ne sont pas strictement identiques car ils ont été mis en place avec un mois d'intervalle. Or, les expériences sont réalisées à température ambiante. Les températures durant la phase de formation des biofilms présentaient des différences assez importantes entre jeux expérimentaux. De plus, le même inoculum de bactéries a été utilisé pour le développement des trois biofilms anodiques. Cette source de bactérie est conservé à froid (4°C) entre les trois inoculations mais peut malgré tout avoir évolué dans le temps. Ainsi, tout en confirmant que les acides boroniques greffés ont un effet positif dans des conditions expérimentales différentes, la comparaison des piles de chaque jeu expérimental met en évidence l'importance des conditions de température sur les

performances des biofilms. Le tableau suivant résume l'ensemble des résultats obtenus pour les piles de chaque jeu expérimental.

Temps nécessaire à la formation du biofilm/mesuré par rapport au temps mis pour atteindre un courant stationnaire (heures)			
	Anode en graphite non modifié	Anode modifiée par des acides phényle boroniques	Anode modifiée par des esters phényle boroniques pinacol [a]
Jeu 1 (20-25 °C)*	215 h	85 h	144 h
Jeu 2 (10-20 °C)*	564 h	468 h	612 h
Jeu 3 (15-20 °C)*	213 h	122 h	-
Densités de courant catalytique moyennes mesurées sur 3 batch [b]			
	Anode en graphite non modifié	Anode modifiée par des acides phényle boroniques	Anode modifiée par des esters phényle boroniques pinacol [a]
Jeu 1 (20-25 °C)*	$299 \pm 18 \text{ mA.m}^{-2}$	$515 \pm 22 \text{ mA.m}^{-2}$	$371 \pm 32 \text{ mA.m}^{-2}$
Jeu 2 (10-20 °C)*	$407 \pm 30 \text{ mA.m}^{-2}$	$1203 \pm 87 \text{ mA.m}^{-2}$	$348 \pm 23 \text{ mA.m}^{-2}$
Jeu 3 (15-20 °C)*	$235 \pm 33 \text{ mA.m}^{-2}$	$368 \pm 43 \text{ mA.m}^{-2}$	-
Densités de puissance maximale moyennes, mesurés sur 3 batch			
	Anode en graphite non modifié	Anode modifiée par des acides phényle boroniques	Anode modifiée par des esters phényle boroniques pinacol [a]
Jeu 1 (20-25 °C)*	$154 \pm 11 \text{ mW.m}^{-2}$	$249 \pm 15 \text{ mW.m}^{-2}$	$204 \pm 11 \text{ mW.m}^{-2}$
Jeu 2 (10-20 °C)*	$214 \pm 10 \text{ mW.m}^{-2}$	$306 \pm 19 \text{ mW.m}^{-2}$	$170 \pm 10 \text{ mW.m}^{-2}$
Jeu 3 (15-20 °C)*	$140 \pm 15 \text{ mW.m}^{-2}$	$195 \pm 20 \text{ mW.m}^{-2}$	-

Tableau 1 Performances obtenues pour les trois jeux expérimentaux. [a] mesuré pour deux piles. [b] Mesuré par voltamétrie cyclique (1mV.s^{-1}). à -0.1 V vs ECS. * Températures pendant la formation des biofilms

Tout d'abord, en comparant les jeux 1 et 3 pour lesquels les températures de développement du biofilm sont proches, on observe des performances quantitativement proches pour les piles de ces deux jeux et surtout on observe le même effet des acides boroniques greffés sur l'amélioration des performances des biofilms. On remarque ainsi que l'anode modifiée avec des acides phényle boroniques entraîne le développement plus rapide du biofilm ainsi que de meilleures performances que pour un biofilm développé sur l'anode en graphite non modifié. Pour l'ensemble des piles du jeu 3, on observe tout de même que les performances sont légèrement plus basses que pour les piles du jeu 1. On peut attribuer cette baisse aux légères différences de températures lors de la formation du biofilm ou encore au vieillissement de l'inoculum lors de son utilisation pour le jeu 3.

Des différences plus remarquables ont été observées sur le jeu expérimental 2 pour lequel les performances sont particulièrement éloignées des piles des jeux 1 et 3. Tout d'abord, on constate que les temps de développement des biofilms pour les trois piles du jeu 2 sont très longs, entre 470 et 610 heures contre moins de 220 heures pour les piles des deux autres jeux. Ce temps de développement important peut s'expliquer par les températures particulièrement basses dans le laboratoire (10°C) pendant les deux premières semaines ayant suivi la mise en place des piles du jeu 2. Durant ces deux semaines de températures fraîches, le développement bactérien a été fortement ralenti, voire inhibé, ce qui explique l'allongement du temps de formation du biofilm. Etrangement, on remarque qu'une fois les biofilms développés, les performances des piles du jeu 2 présentent de façon générale des performances supérieures à celles des biofilms des deux autres jeux 1 et 3. Il est depuis longtemps admis que l'activité d'une communauté bactérienne établie et développée dépend de la température et qu'il existe des températures optimales de fonctionnement des biofilms. Dans nos piles étudiées, les conditions basses de température ont pu entraîner une sélection de souches bactériennes électroactives plus performantes. Il n'existe cependant que très peu de données dans la littérature permettant de faire le lien entre les performances d'un biofilm et les conditions de température appliquées lors de sa formation. Une publication récente est en accord avec les résultats de nos expériences de développement de biofilms à basse température (Liu et al. 2012). Les auteurs montrent que les biofilms développés à basse température (15°C), lorsqu'ils sont remis à température ambiante (25°C) délivrent des courants et des puissances maximales supérieurs à ceux d'un biofilm développé à température ambiante (25°C). L'amélioration des performances des biofilms développés à basse température a été attribuée à la présence d'espèces bactériennes différentes. Les auteurs montrent en particulier la présence de deux espèces adaptées à des basses températures, *Simplicispira psychrophila* et *Geobacter psychrophilus*. Finalement, on constate par l'étude du jeu expérimental 2 que les acides phényle boroniques greffés sur la surface de l'anode ont permis d'accélérer la formation du biofilm et d'améliorer ses performances, malgré des conditions de températures plutôt extrêmes pour une bioanode microbienne.

Les autres différences constatées sont les résultats obtenus sur les anodes modifiées par des acides boroniques protégés par des ester pinacol, étudiés dans les jeux 1 et 2. Dans les deux cas, on constate que les performances obtenues sur ces anodes sont moins bonnes que les performances obtenues les anodes modifiées avec les acides phényle boroniques déprotégés. Cependant, les performances des bioanodes développées sur les acides boroniques protégés

par des ester pinacols sont meilleures que celles des bioanodes développées sur graphite non modifié dans le jeu 1 et moins bonnes dans le cas du jeu 2. Ces différences constatées avec le graphite non modifié peuvent être due à la déprotection spontanée des acides boroniques sur la surface des électrodes. Cette hypothèse de déprotection spontanée est en accord avec les données de la littérature et avec nos données de spectroscopie infrarouge. Il s'agit d'une déprotection non contrôlée, ce qui expliquerait que les surfaces modifiées avec des acides phényle boroniques pinacol ester puissent avoir des performances difficilement répétables. Dans le cas du jeu 2, on peut penser que les températures basses durant deux semaines ont limité la déprotection spontanée par rapport au jeu 1. Dans le cas où la majorité des acides boroniques restent protégés par les groupements pinacol, on observe que la modification a un effet négatif sur la formation et les performances du biofilm. Ceci est peut être à relier avec le transfert électronique ralenti sur les surfaces modifiées avant l'étape de déprotection.

Ainsi l'analyse de ces trois jeux expérimentaux démontre l'effet positif des acides boroniques sur les performances des bactéries, pour différentes conditions de température de développement. Les données du jeu 2 sont particulièrement intéressantes. En effet, l'étude de ce jeu apporte des résultats supplémentaires démontrant que l'effet des fonctions acides boroniques greffés est effectif même dans des conditions défavorables au développement bactérien.

Conclusion et Perspectives

Nos études ont donc montré que le greffage covalent d'acides phényle boroniques sur la surface d'électrodes entraîne une amélioration des performances de bioanodes microbiennes. Nous avons constaté une accélération de la formation du biofilm électroactif, une augmentation des puissances produites et une augmentation des courants catalytique dus à l'oxydation de l'acétate par les biofilms développés sur acides phényles boroniques. L'effet des fonctions chimiques acides boroniques sur les performances des bioanodes a été démontré sur trois jeux expérimentaux différents, sous différentes conditions de température lors du développement des biofilms électroactifs. Une grande partie des résultats présentés dans ce chapitre ont fait l'objet d'une publication dans un numéro spécial du journal *Electroanalysis* consacré à la bioélectrochimie en France (Lapinsonnière et al. 2013). Notre stratégie est originale par rapport aux études publiées jusqu'ici pour améliorer les surfaces d'électrodes du point de vue de la colonisation par un biofilm électroactif. En effet, dans notre étude, la molécule greffée vise de façon spécifique un composant des membranes bactériennes.

Les acides boroniques étant connu pour leur interaction forte avec des diols et notamment avec des glucides, on peut attribuer ces améliorations à un attachement privilégié des bactéries sur la surface d'électrodes via les lipopolysaccharides de leur membrane externe et les acides boroniques de l'électrode. Cependant, il est très probable que l'effet des acides boroniques sur les biofilms électroactifs soit plus complexe. En effet, les biofilms formés sur les électrodes fonctionnalisées par des acides phényle boroniques ont une structure différente des biofilms formés sur du graphite non modifié, avec notamment une sécrétion d'exopolysaccharides plus abondante. On peut en déduire que les acides boroniques greffés n'ont pas qu'un rôle dans l'attachement des premières couches de bactéries mais qu'ils influencent également la physiologie des biofilms. Quelques études publiées dans la littérature viennent soutenir cette hypothèse. En effet, il a été démontré que les acides boroniques pouvaient pénétrer dans les bactéries par les membranes lipidiques et faciliter ainsi le transport de diverses molécules telles que des glucides ou des ribonucléotides (Westmark et Smith 1994, 1996). Parmi l'ensemble de ces molécules, nous avons discuté de la possible implication d'un ribonucléotide particulier, le c-di-GMP, régulant l'expression des pilis en surface des bactéries. Une modulation de l'expression des pilis auraient une influence sur l'orientation des bactéries sur la surface des électrodes mais aussi sur le transfert électroniques extracellulaire. De plus, l'interaction des acides boroniques avec les doubles couches lipidiques des membranes entraînent une modification de la fluidité

des membranes en les rendant plus rigides (Westmark et al 1996). D'autres auteurs montrent que les acides boroniques ont une forte affinité pour un composant des membranes bactériennes, l'acide N-acétylneuraminique (structure ci-dessous), jouant un rôle dans la signalisation cellulaire et la pathogénicité des bactéries (Otsuka et al 2003).

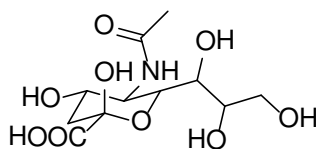


Figure 26 Structure de l'acide N-acétylneuraminique

On peut imaginer que par interaction avec le N-acétylneuraminic acide, les acides phényles boroniques greffés influencent les signaux inter-bactériens et augmente la tendance à former des multicouches de bactéries dans le biofilm, ce qui expliquerait les différences d'épaisseur constatées.

Un moyen de mieux comprendre l'interaction avec des acides boroniques greffées sur les électrodes serait d'utiliser d'autres types de bactéries électroactives dont la membrane comprend moins de glucides, par exemple des bactéries Gram-positive, dépourvues de lipopolysaccharides. Bien que la majorité des bactéries électroactives à l'anode des systèmes microbioélectrochimiques, il existe quelques exemples de telles bactéries notamment une souche *Lactococcus lactis* étudiée par Freguia et al. (2009) ou encore une souche de *Thermincola potens* étudiée par Wrighton et al. (2011).

3 Section expérimentale du chapitre 3

3.1 Modification d'électrode par greffage électrochimique de sels d'aryle diazonium

3.1.1 Synthèse du sel de paradiazophénylboronique pinacol ester

Dans un tube de Schlenk, sous argon, 2.5 mmol d'acide para-aminophénylboronique pinacol ester sont dissout dans 12 mL d'acétonitrile. Dans un second schlenk, sous argon et sous agitation, 2.7 mmol de NOBF_4 sont dissous dans 5 mL d'acétonitrile puis refroidi à -40°C dans un bain acétonitrile et d'azote liquide. Les 12 mL de la solution d'amine sont canulés goutte à goutte dans la solution de NOBF_4 . La solution prend une coloration orangé. La solution est agitée pendant 1 heure à -40°C , puis placée sur un bain de glace pendant 20 min. On fait ensuite précipiter le produit en canulant la solution obtenue dans un grand volume (800mL) d'éther diéthylique placé dans un bain de glace. Le produit est récupéré ensuite par filtration sur fritté, sous la forme d'une pâte blanche cristalline. Le produit obtenu n'étant pas sec, il est placé dans un pilulier à l'abri de la lumière sous une hotte pour la nuit. En quelques heures, le produit prend une légère coloration rosée. Le spectre RMN ^1H du produit obtenu est présenté ci-dessous.

RMN ^1H (400MHz ; D_2O ; δ ppm) (voir ci après)

Le spectre RMN ^1H du produit obtenu montre qu'on obtient le sel de diazonium en majorité (77%) mais qu'il reste du produit de départ à 18% ainsi qu'un produit de dégradation qui pourrait être l'acide para-hydroxyphénylboronique pinacol ester.

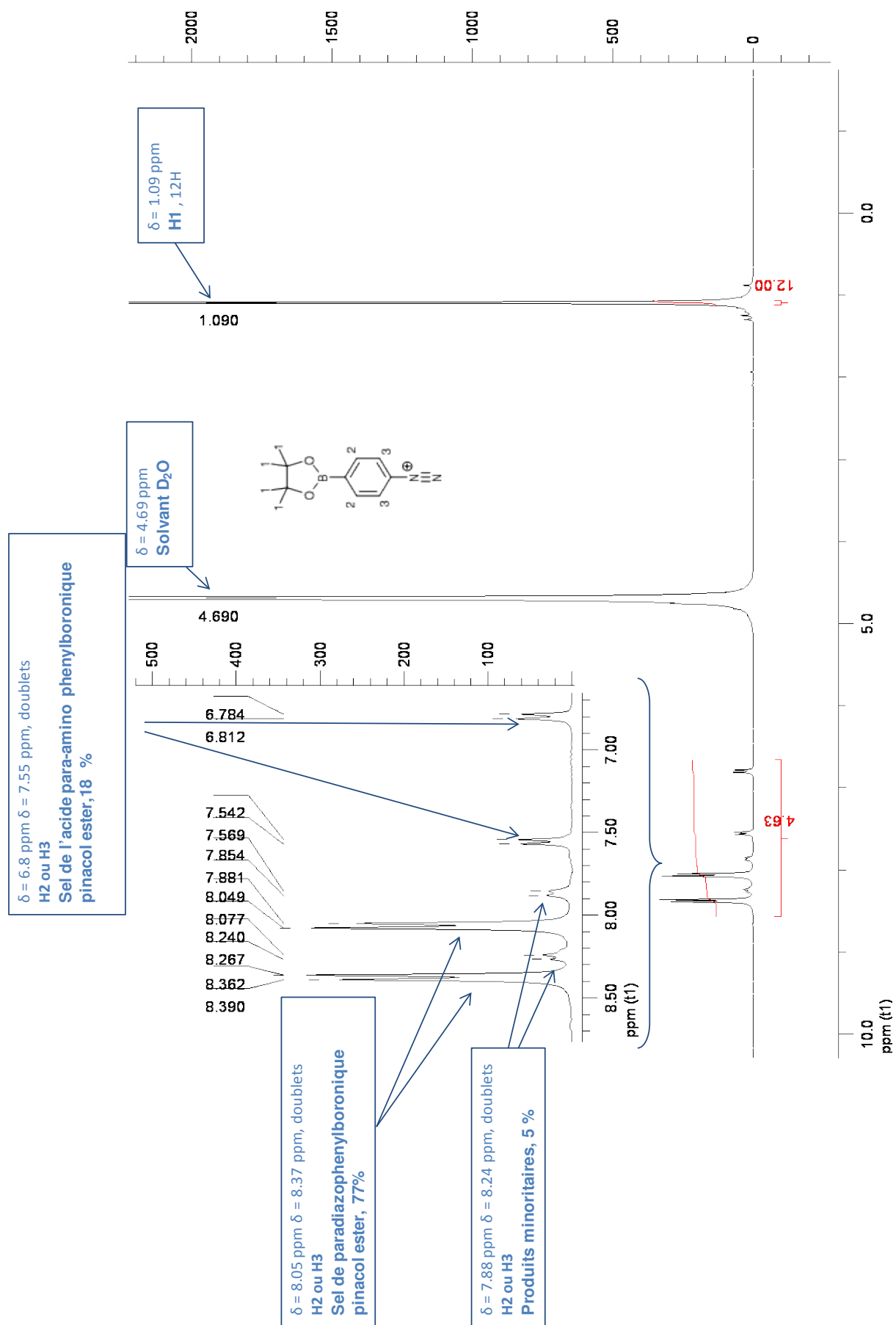


Figure 27 Spectres RMN du produit obtenu après l'essai d'isolation du sel de paradiazophenylboronique pinacol ester

3.1.2 Modification électrochimique des électrodes à partir de l'acide 4 aminophenyle boronique pinacol ester

Les électrodes d'or, de carbone vitreux, et de graphite sont polies avant utilisation. Les électrodes d'or et de carbone vitreux (IJ Cambria) sont des électrodes de petit diamètre (0.4 mm) servant aux études analytiques. Elles sont polies à l'aide de papiers abrasifs de taille de grain différents (14 puis 8 et enfin 5 μm). Les électrodes de graphite (Einsenhut GmbH & Co) sont des plaques d'une vingtaine de cm^2 qui servent à l'étude dans l'anode de piles à combustible microbiologiques. Avant utilisation, les électrodes sont polies à l'aide d'un papier abrasif (taille de grain : 22 μm , Struers) et passées rapidement au bain à ultrasons. Un troisième type d'électrode est utilisé, il s'agit de plaques de verre sur lesquelles est déposée une fine couche d'oxyde indium étain, appelée plaques d'ITO.

Lors de la modification, nous avons fait le choix de générer le sel de diazonium *in situ*. La solution de modifiant est donc préparée par dissolution de 10 mM de l'amine de départ, l'ester 4-aminophenyle boronique (Sigma Aldrich) dans 0.1 M de HCl. La cellule électrochimique contenant la solution est refroidie sous bain de glace et dégazée par bullage d'argon. L'électrode de référence est l'Electrode au Calomel Saturé (ECS), la contre électrode est une plaque ou un barreau de graphite présentant une surface supérieure à celle de l'électrode de travail. Du nitrite de sodium NaNO_2 est ajouté au dernier moment à la solution (concentration finale de 20 mM). Après quelques secondes de mélange de la solution, on polarise par voltamétrie cyclique l'électrode de travail dont on veut modifier la surface entre 0.2 et -0.4 V vs ECS, à une vitesse de balayage de 0.1 V.s^{-1} . Les charges consommées pendant la réaction de greffage sont enregistrées et contrôlées à chaque cycle.

Après modification, les électrodes sont rincées soigneusement à l'eau ultrapure, à l'acétone très brièvement puis à nouveau à l'eau ultra pure. Les électrodes modifiées sont ensuite trempées dans une solution de périodate de sodium (500 mM NaIO_4) dans un mélange THF :eau 4 :1. Plusieurs essais de temps de réactions ont été réalisés allant d'une demi-heure à une nuit.

3.1.3 Etude des surfaces modifiées

Etude du transfert hétérogène d'électron entre une sonde redox en solution, le ferricyanure de potassium, et la surface des électrodes

Le transfert électronique vers les électrodes a été évalué en étudiant par voltamétrie cyclique l'oxydoréduction du ferricyanure de potassium utilisé comme sonde redox à la surface des électrodes. Des voltamétries cycliques de l'oxydo-réduction du ferricyanure (2mM dans KCl 0.1 M et Tampon Phosphate 10 mM pH 7) ont été réalisées sur les électrodes nues, les électrodes fonctionnalisées des esters phényles boroniques pinacol avant et après déprotection.

Etudes des surfaces fonctionnalisées par spectroscopie infrarouge

Nous avons utilisé la spectroscopie infrarouge à Transformée de Fourier permettant l'acquisition rapide de données d'une grande précision, en mode ATR (Attenuated Total Reflection). Dans ce mode, les signaux recueillis sont ceux réfléchis par la surface du matériau à analyser, ici une plaque d'ITO. La modification par greffage électrochimique sur ITO est susceptible d'être légère. Afin de détecter au mieux les fonctionnalités chimiques, nous avons choisi i) de modifier fortement les plaques d'ITO, ii) d'utiliser un détecteur infra rouge performant MCT (Mercury Cadmium Telluride) et iii) d'augmenter le nombre de balayages sur la surface à 500.

Afin d'interpréter les spectres de façon correcte, nous avons utilisé des plaques modifiées par des phényles et des 4-méthyl phényles greffés de façon électrochimique, schématisées ci-dessous

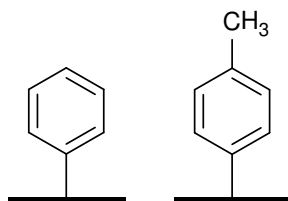


Figure 28 Surface modifiée à partir d'aniline (gauche) et à partir de para-toluidine (droite)

Les spectres obtenus sur ces surfaces (voir **Figure 29**) ont permis de confirmer l'attribution des bandes C-H aliphatiques et C-H aromatiques sur les spectres obtenus pour les surfaces modifiées par les acides phényle boroniques pinacol ester non déprotégés. En effet, sur la plaque d'ITO modifiée à partir d'aniline, on observe une bande centrée autour de 3200 cm^{-1} , confirmant que cette bande est liée à la vibration des liaisons C-H aromatiques. Sur la plaque d'ITO modifiée à partir de para toluidine, on retrouve une bande centrée autour de 3200 cm^{-1} liée aux liaisons C-H aromatiques des polyphénylènes greffés et un groupe de trois bandes entre 2800 et 2900 cm^{-1} qu'on peut donc attribuer aux liaisons C-H aliphatiques des fonctions méthyles greffées.

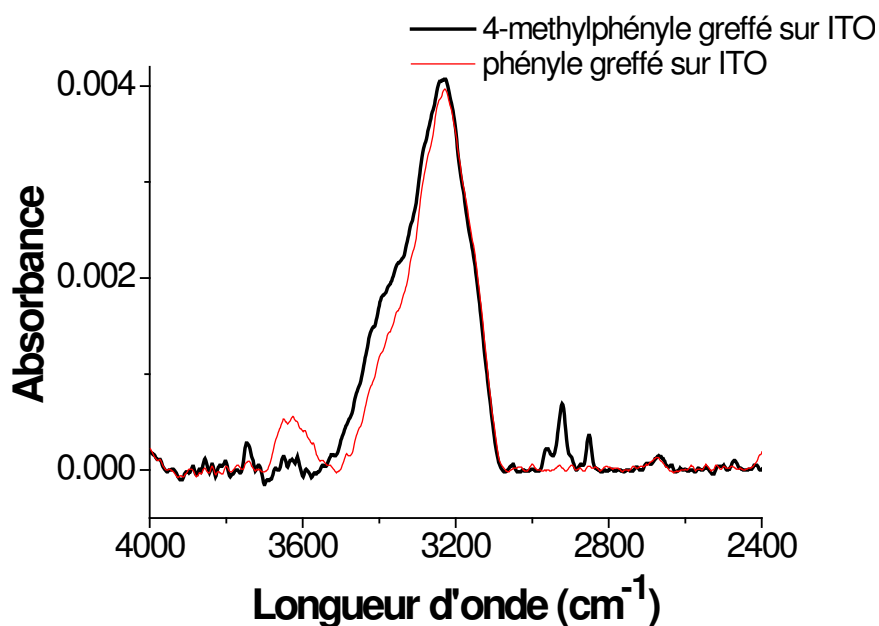


Figure 29 Spectres IR de surfaces modifiées avec des 4-méthylbenzenes (— noir) et des phényles (— rouge) confirmant l'attribution des bandes dues aux vibrations des C-H aliphatiques et des C-H aromatiques greffés sur une surface d'ITO.

De plus, nous avons comparé les spectres d'acides phényle boronique pinacol ester et d'acides phényle boronique commerciaux non greffés.

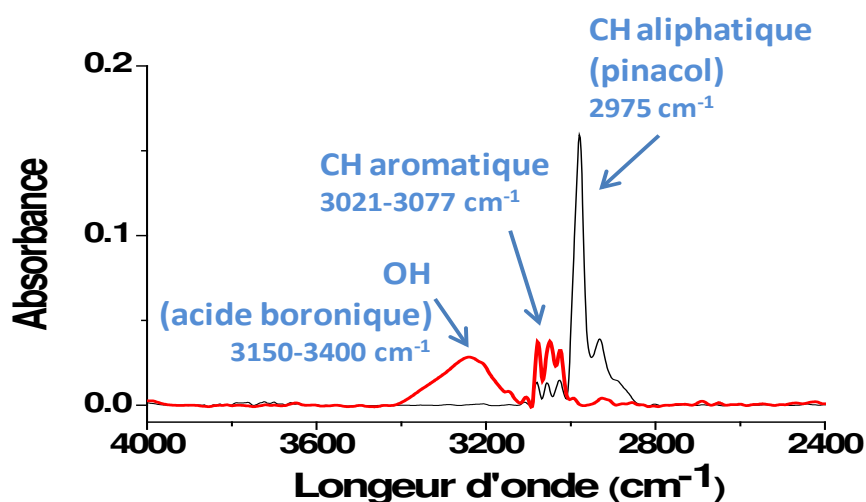


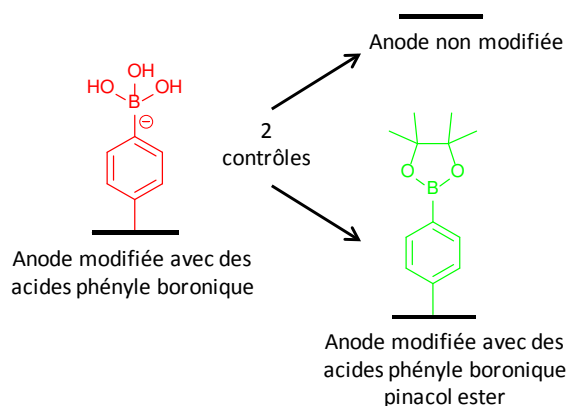
Figure 30 Spectres IR enregistrés sur les poudres commerciales d'esters phényle boroniques pinacol (— noir) et d'acides phényle boroniques (— rouge)

Malgré des formes différentes et un décalage des longueurs d'ondes, l'allure générale des spectres des molécules greffées et des poudres commerciales sont similaires. Ces spectres confirment l'interprétation faite des bandes obtenues sur les surfaces fonctionnalisées, notamment avec la disparition des bandes CH aliphatiques et l'apparition de bandes OH après déprotection.

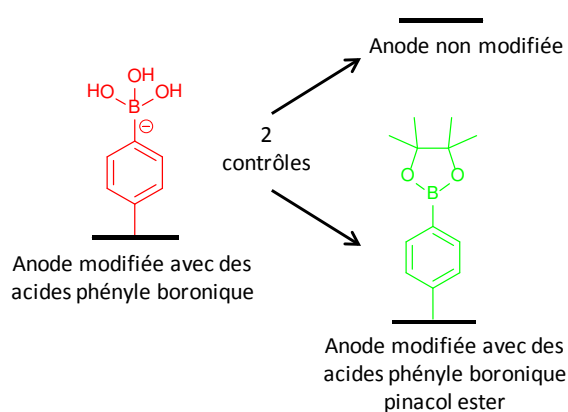
3.2 Etudes expérimentales des piles

Jeux de piles étudiés

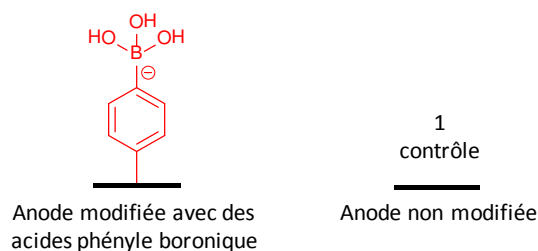
Jeu 1 : La température durant le développement des biofilms (correspondant à un courant faible temps puis à l'augmentation exponentielle du courant délivré par le biofilm) est la température du laboratoire. Elle est comprise entre 20 et 25 °C, ce qui est un peu au dessus de la moyenne des températures du laboratoire.



Jeu 2 : La température durant le développement des biofilms est de 10°C pendant les 14 jours suivant la mise en place du jeu expérimental. Durant ces 14 jours, le courant délivré par l'ensemble des piles est constant et reste faible. Lorsque la température augmente à 20°C, on observe une rapide augmentation des courant délivrés, correspondant la connexion de biofilms électroactifs sur l'électrode.



Jeu 3 : La température durant la formation de biofilm est comprise entre 15 et 20°C, ce qui correspond à la moyenne des températures du laboratoire.



Dispositifs utilisés

Les dispositifs utilisés sont les mêmes que ceux décrits dans la section expérimentales du Chapitre 1

Mesures de performances des piles

Les procédures de mesures des performances des piles sont celles décrites dans la section expérimentales du Chapitre 1

Images par Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

Il s'agit d'un microscope avec un pouvoir séparateur et une profondeur de champ supérieure au microscope optique. Il repose en effet sur l'utilisation d'électrons accélérés dont le rayonnement est de plus courte longueur d'onde que celui de la lumière visible utilisée par la microscopie optique. Dans le cas d'un microscope électronique à balayage, un faisceau d'électrons accélérés explore l'échantillon plan par plan. Les électrons rétrodiffusés et émis par l'échantillon sont détectés et transformés en image sur un écran cathodique. Cette technique d'observation ne peut s'utiliser que sur des échantillons conducteurs et nécessite la mise sous vide de la chambre d'observation afin d'éviter le freinage et la déviation des électrons dans l'air. L'observation d'échantillons biologiques, qui sont fragiles, non conducteurs et composés majoritairement d'eau nécessite une préparation préalable.

Tout d'abord, l'échantillon doit être fixé afin de conserver sa structure aussi proche que possible de son état vivant. Dans notre cas, les échantillons de biofilms prélevés en sectionnant des morceaux de quelques cm^2 sur les bioanodes sont trempés une nuit dans une solution de glutaraldéhyde diluée à 2.5 % dans du Tampon Phosphate 0.1 M pH 7. Le glutaraldéhyde est un agent réticulant et permet de créer des liaisons chimiques entre les différentes molécules constituant les bactéries et la matrice d'exopolymères.

Puis, l'échantillon doit être complètement déshydraté afin d'éviter que l'évaporation brutale de l'eau des échantillons n'endommage les structures fragiles des cellules microbiennes dans la chambre d'observation, mise sous vide. La technique que nous avons employée est l'évaporation à l'état supercritique. Durant l'état supercritique, les densités des phases liquide et gazeuse sont identiques et la tension de surface entre les deux phases est très faible, ce qui permet un passage liquide à gaz en douceur à travers les structures biologiques. Pratiquement, on remplace progressivement l'eau de l'échantillon par de l'éthanol ou de l'acétone en le faisant tremper dans des bains contenant une concentration croissante en éthanol/acétone. Dans la procédure que nous avons utilisée les échantillons sont laissés un quart d'heure dans des bains à 50 %, 70%, 90 % puis 100% d'éthanol puis 100% acétone. L'acétone est ensuite évaporée en élevant progressivement la température et la pression jusqu'à atteindre l'état super critique.

Enfin, les échantillons sont rendus conducteurs par pulvérisation cathodique d'une couche mince d'or-palladium.

Références du Chapitre 3

A

Anariba F. A., DuVall S. H., McCreery R. L.
Analytical Chemistry **75**, 2003, 3837-3844
"Mono- and Multilayer Formation by Diazonium Reduction on Carbon Surfaces Monitored with Atomic Force Microscopy 'Scratching' "

B

Bélanger D., Pinson J.
Chemical Society Reviews **40**, 2011, 3995-4009
"Electrografting: a powerful method for surface modification"

Busscher H. J., van der Mei H. C.
"Use of flow chamber devices and images analysis methods to study microbial adhesion"
in "Methods in Enzymology Volume 253: Adhesion of Microbial Pathogens,"
Doyle R. J. (Ed), *Academic press San Diego*, 1995, 455,447

C

Çamli S.T., Şenel Ş., Tuncel A.
Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **207**, 2002, 127-137
"Nucleotide isolation by boronic acid functionalized hydrophilic supports"

Cheng S. A., Logan B. E
Electrochemistry Communications **9**, 2007, 492-497
"Ammonia treatment of carbon cloth anodes to enhance power generation of microbial fuel cells"

Conrad J. C. , Gibiansky M. L., Jin F., Gordon V. D., Motto D. A., Mathewson M. A., Stopka W. G., Zelasko D. C., Shrout J. D., Wong G. C. L.
Biophysical Journal **100**, 2011, 1608-1616
"Flagella and Pili-Mediated Near-Surface Single-Cell Motility Mechanisms in *P. aeruginosa*"

Costerton J. W., Lappin-Scott H. M.
"Introduction to Microbial Biofilms"
in "Microbial biofilms, Plant and microbial biotechnology research series"
Lappin-Scott H. M., Costerton J. W. (Eds.), *University Press, Cambridge, UK*, **5**, 1995, 1-11

Costerton J. W., Montarano L., Arciola C. R.
The International Journal of Artificial Organs **28**, 2005, 1062-1068
"Biofilms in implant infections: its production and regulation"

Crittenden S. R., Sund C. J., Summer J. J.
Langmuir **22**, 2006, 9743-9476
"Mediated electron transfer from bacteria to a gold electrode via self-assembled monolayer"

E

Elmas B., Onur M. A., Senel S., Tuncel A.
Colloid and Polymer Science **280**, 2002, 1137-1146
“Temperature controlled RNA isolation by N-isopropylacrylamide-vinyl phenylboronic acid copolymer latex”

F

Fan Y., Xu S., Schaller R., Jiao J., Chaplen F., Liu H.
Biosensors and Bioelectronics **26**, 2011, 1908-1912
“Nanoparticle decorated anodes for enhanced current generation in microbial electrochemical cells”

Feng S., Yang Q., Wang X., Logan B. E.
Journal of Power Sources **195**, 2010, 1841-1844
“Treatment of carbon fiber brush anodes for improving power generation in microbial fuel cells”

Freguia S., Masuda M., Tsujimura S., Kano K.
Bioelectrochemistry **76**, 2009, 14-18
“*Lactococcus lactis* catalyses electricity generation at microbial fuel cell anodes via excretion of soluble quinone”

G

Gottenbos B., van der Mei H. C., Busscher H. C., Grijpma D. W., Feijnen J.
Journal of Materials Science: Materials in Medicine **10**, 1999, 853-855
“Initial adhesion and surface growth of *Pseudomonas aeruginosas* on negatively and positively charged poly(methacrylates)”

Gottenbos B., van der Mei H. C., Busscher H. C.
Journal of Biomedical Materials Research **50**, 2000, 208-214
“Initial adhesion and surface growth of *Pseudomonas aeruginosas* on biomedical polymers”

Guo K., Freguia S., Dennis P. G., Chen X., Donose B. C., Keller J., Gooding J. J., Rabaey K.
Environmental Science and Technology **47**, 2013, 7563-7550
“Effects of surface charge and hydrophobicity on anodic biofilm formation, community composition, and current generation in bioelectrochemical systems”

H

Harper, J. C., Polsky R., Wheeler D. R., Lopez D. M., Arango D. C., Brozik S. M.
Langmuir **25**, 2009, 3282-3288
“A multifunctional thin film Au electrode surface formed by consecutive electrochemical reduction of aryl diazonium salts”,.

Hibiya K., Tsuneda S., Hirata A.
Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **18**, 2000, 105-112
“Formation and characteristics of nitrifying biofilm on a membrane modified with positively-charged polymers chains”

J

James T. D., Samakumara Sandanyake K. R. A., Shinkai S.
Angewandte Chemie International Edition in English **35**, 1996, 1910-1922
"Saccharide sensing with molecular receptors based on boronic acid"

Jiang D. Q., Li B. K.
Water Science Technology **59**, 2009, 557-563
"Novel electrode materials to enhance the bacterial adhesion and increase the power generation in microbial fuel cells (MFCs)"

K

Kabanov D. S., Prokhorenko I. R.
Biochemistry **75**, 2010, 383-404
"Structural analysis of lipopolysaccharide from Gram-negative bacteria"

Kariuki J. K., McDermott M. T.
Langmuir **19**, 1999, 6534-6540.
"Nucleation and Growth of Functionalized Aryl Films on Graphite Electrodes"

Kim J. R., Min B., Logan B. E.
Applied Microbial Biotechnology **68**, 2005, 23-30
"Evaluation of procedures to acclimate a microbial fuel cell for electricity production"

Kuivila H., Keough A. H., Soboczenski E. J.
Journal of Organic Chemistry **19**, 1954, 780-783
"Areneboronates from diols and polyols"

L

Lapinsonnière L., Picot M., Poriel C., Barrière F.
Electroanalysis **25**, 2013, 601-605
"Phenylboronic Acid Modified Anodes Promote Faster Biofilm Adhesion and Increase Microbial Fuel Cell Performances"

Lee V. T., Matewish J. M., Kessler J. L., Hyodo M., Hayakawa Y., Lory S.
Molecular Microbiology **65**, 2007, 1474-1484
"A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production"

Liu L., Tsyganova O., Lee D. J., Su A., Chang J. S., Wang A., Ren N.
International Journal of Hydrogen Energy **37**, 2012, 15792-15800
"Anodic biofilm in single-chamber microbial fuel cells cultivated under different temperatures"

Lorand J. P., Edwards J. O.
Journal of Organic Chemistry **24**, 1959, 769-774
"Polyol complexes and structure of the benzeneborate ion"

Lowy D. A., Tender L. M., Zeikus J. G., Park D. H., Lovley D. R.
Biosensors and Bioelectronics **21**, 2006, 2058-2063
"Harvesting energy from the marine sediment-water interface II – Kinetic activity of anode materials"

Lowy D. A., Tender L. M

Journal of Power Sources **185**, 2008, 70-75

"Harvesting energy from the marine sediment-water interface III – Kinetic activity of quinone- and antimony-based anode materials"

M

Mack D., Becker P., Chatterjee I., Dobinsky S., Knobloch J. K., Peters G.

The International Journal of Artificial Organs **294**, 2004, 203-212

"Mechanisms in *Staphylococcus epidermis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses"

McCreery R. L.

Chemical Reviews **108**, 2008, 2646-2687

"Advanced carbon electrode material for molecular electrochemistry"

Murphy J. M., Tzschucke C. C., Hartwig J. F.

Organic Letters **9**, 2007, 757-760

"One-pot synthesis of arylboronic acids and aryl trifluoroborates by Ir-catalyzed borylation of arenes"

N

Nishiyabu R., Kubo Y., James T. D., Fossey J. S.

Chemical Communications **42**, 2012, 1106-1123

"Boronic acid building blocks : tools for sensing and separation"

O

Otsuka H., Uchimura E., Koshino H., Okano T., Kataoka K.

Journal of the American Chemical Society **125**, 2003, 3493-3502

"Anomalous Binding Profile of Phenylboronic Acid with N-Acetylneuraminic Acid (Neu5Ac) in Aqueous Solution with Varying pH"

P

Park D. H., Kim B. H., Moore B., Hill H. A. O., Song M. K., Rhee H. W.

Biotechnology Techniques **11**, 1997, 147-148

"Electrode reaction of *Desulfovibrio desulfuricans* modified with organic conductive compounds"

Park D. H., Zeikus J. G.

Applied Environmental Microbiology **59**, 2000, 192-197

"Electricity generation in microbial fuel cells using Neutral Red as an electronophore"

Park D. H., Zeikus J. G.

Applied Environmental Microbiology **66**, 2002, 58-61

"Impact of electrode composition on electricity generation in a single-compartment fuel cell using *Shewanella putrefaciens*"

Patil S. A., Hasan K., Leech D., Hägerhäll C., Gorton L.

Chemical Communications **45**, 2012, 10183-10185

"Improved microbial electrocatalysis with osmium polymer modified electrodes"

Picot M., Lapinonnière L., Rothballer M., Barrière F.
Biosensors and Bioelectronics **28**, 2011, 181-188
"Graphite anode surface modification with controlled reduction of specific aryl diazonium salts for improved microbial fuel cells power output"

Picot M.
Thèse de l'Université de Rennes 1, 2012, France
« Pile à combustible microbienne à plante : contribution à l'optimisation des éléments anodique, membranaire et cathodique »

Pidhatika B., Möller J., Benetti E. M., Konradi R., Rakhmatullina E., Mühlebach A., Zimmermann R., Werner C., Vogel V., Textor M.
Biomaterials **31**, 2010, 9462-9472
"The role of the interplay between polymer architecture and bacterial surface properties on the microbial adhesion to polyoxazoline-based ultrathin films"

Pinson J., Povorica F.
Chemical Society Reviews **34**, 2005, 429-439
"Attachment of organic layers to conductive or semiconductive surfaces by reduction of diazonium salts"

Polsky R., Harper J. C., Wheeler D. R., Arango D. C., Brozik S. M.
Angewandte Chemie International Edition **47**, 2008, 2631-2634
"Electrically addressable cell immobilization using phenylboronic acid diazonium salts"

R

Rasmussen K., Østgaard K.
Water Research **37**, 2003, 519-524
"Adhesion of marine bacterium *Pseudomonas* sp. NCIMB 2021 to different hydrogel surfaces"

Rinaldi A., Mecheri B., Garavaglia V., Licoccia S., Di Nardo P., Traversa E.
Energy and Environmental Science **1**, 2008, 417-429
"Engineering materials and biology to boost performance of microbial fuel cells: a critical review"

Ross M. F., Kelso G. F., Blaikie F. H., James A. M., Cochemé H. M., Filipovska A., Ros T. D., Hurd T. D., Smith R. A. J., Murphy M. P.
Biochemistry **70**, 2005, 222-230
"Lipophilic triphenylphosphonium cations as tools to mitochondrial bioenergetics and free radical biology"

Rzhapishevskaya O., Hakobyana S., Ruhala R., Gautrot J., Barberoc D., Ramstedt M.
Biomaterial Sciences **1**, 2013, 589-602
"The surface charge of anti-bacterial coatings alters motility and biofilm architecture"

S

Saito T., Mehanna M., Wang X., Cisick R. D., Feng Y., Hickner A. A., Logan B. E.
Bioresource Technology **102**, 2011, 395-398
"Effect of nitrogen addition on the performances of microbial fuel cell anodes"

Scott K., Rimbu G. A., Katuri K. P., Prasad K. K., Head I. M.
Process Safety and Environmental Protection **85**, 2007, 481-488
"Application of modified carbon anodes in microbial fuel cells"

Stams A. J. M., de Bok F. A. M., Plugge C. M., Van Eekert M. H. A., Dofing J., Shraa G.
Environmental Microbiology **8**, 2006, 371-382
"Exocellular electron transfer in anaerobic microbial communities"

T

Tang X., Guo K., Li H., Du Z., Tian J.
Bioresource Technology **102**, 2011, 3558-3560
"Electrochemical treatment of graphite to enhance electron transfer from bacteria to electrodes"

Terada A., Yuasa A., Kushimoto T., Tsuneda S., Katakai A., Tamada M.
Microbiology **152**, 2006, 3575-3583.
"Bacterial adhesion to and viability on positively charged polymer surfaces"

V

Vinogradov E., Korenenvsky A., Lovley D. R., Beveridge T. J.
Carbohydrate Research **339**, 2004, 2901-2904
"The structure of the core region of lipopolysaccharide from *Geobacter sulfurreducens*"

W

Wannapob R., Kanatharana P., Limbut W., Numnuam A., Asawatreratanakul P., Thammakhet C., Thavarungkul P.
Biosensors and Bioelectronics **26**, 2010, 357-364
"Affinity sensor using 3-aminophenylboronic acid for bacteria detection"

Wang G. X., Bao W. J., Wang M., Xia X. H.
Chemical Communications **48**, 2012, 10859-10861
"Heme plan orientation dependent direct electron transfer of cytochrome c at SAMs/Au electrodes with different wettability"

Wang Q., Zhi F. P., Wang T., Xia X. H., Li X. H., Meng F. F., Song Y. Y., Yong C., Lu X.
Journal of Physical Chemistry C **113**, 2009, 9359-9367
"Direct Electron Transfer of Thiol-Derivatized Tetraphenylporphyrin Assembled on Gold Electrodes in an Aqueous Solution"

Wang X., Cheng S. A., Feng Y. J., Merrill M. D., Saito T., Logan B. E.
Environmental Science Technology **40**, 2009, 6870-6874
"Use of carbon mesh anodes and the effects of different temperature pretreatment methods on power production in microbial fuel cells"

Westmark P. R., Smith B. D.

Journal of the American Chemical Society **116**, 1994, 9343-9344

"Boronic acids selectively facilitate glucose transport through a lipid bilayer"

Westmark P. R., Smith B. D.

Journal of Pharmaceutical Sciences **75**, 1996, 266-269

"Boronic acids facilitate the transport of ribonucleosides through lipid bilayers"

Westmark P. R., Gardiner S. J., Smith B. D.

Journal of the American Chemical Society **118**, 1996, 11093-11100

"Selective Monosaccharide Transport through Lipid Bilayers Using Boronic Acid Carriers"

Wrighton K. C., Thrash J. C., Melnyk R. A., Bigi J. P.

Applied and Environmental Microbiology **77**, 2011, 7633-7639

"Evidence for direct electron transfer by a gram positive bacterium isolated from a microbial fuel cell"

Z

Zhao F., Wanatabe K., Nakamura R., Mori S., Liu H., Ishii K., Hashimoto K.

Chemistry – A European Journal **16**, 2010, 4982-4985

"Three-Dimensional Conductive Nanowire Networks for Maximizing Anode Performance in Microbial Fuel Cells"

Zhou J., Zheng J., Jiang S. Y.

Journal of Physical Chemistry B **108**, 2004, 17418-17424

"Molecular Simulation Studies of the Orientation and Conformation of Cytochrome c Adsorbed on Self-Assembled Monolayers"

Zhou M., Chi M., Wang T., Jin T.

Biochemical Engineering Journal **60**, 2012, 151-155

"Anode modification by electrochemical oxidation: A new practical method to improve the performances of microbial fuel cells"

Zhu N., Chen X., Zhang T., Wu P., Li P., Wu J.

Bioresource Technology **1**, 2011, 422-426

"Improved performance of membrane free single chamber air cathode microbial fuel cells with nitric acid and ethylene diamine surface modified activated carbon fiber felt anodes"

Zou Y. J., Xiang C., Yang L., Sun L. X., Xu F., Cao Z.

International Journal of Hydrogen Energy **33**, 2008, 4856-4862

"A mediatorless microbial fuel cell using polypyrrole coated carbon nanotube composite as anode material"

Chapitre 4

Etude de l'effet combiné de nanotubes de carbones et d'acides phényle boroniques sur les performances de bioanodes microbiennes

Sommaire

Introduction	201
1 Point bibliographique sur les nanotubes de carbone et leur effets sur la connexion de biofilms microbiens anodiques	202
1.1 Propriétés des nanotubes de carbone	202
1.2 Utilisation des nanotubes de carbone dans des systèmes microbioélectrochimiques	204
2 Etude des films de nanotubes de carbone déposés sur graphite et greffage d'acides phényles boroniques.....	207
2.1.1 Caractérisation des films de nanotubes de carbone déposés sur graphite	207
2.1.2 Etude de la modification des films de nanotubes de carbone	208
3 Influence combinée des nanotubes de carbone et des acides phényles boroniques sur les performances d'anodes microbiologiques	210
3.1.1 Temps de formation des biofilms.....	210
3.1.2 Catalyse de la réduction de l'acétate	211
3.1.3 Aspects des biofilms microbiens	213
Conclusion.....	215
Section expérimentale.....	216
Fabrication des électrodes	216
Dispositifs microbioélectrochimiques	216
Références du Chapitre 4.....	217

Introduction

Les nanotubes de carbone constituent un matériau carboné nanostructuré dont les propriétés et les applications électrochimiques ont été beaucoup étudiées ces vingt dernières années. Les travaux de recherche sur ce nouveau matériau montrent qu'il possède des propriétés intéressantes dans le domaine des piles enzymatiques, des biocapteurs et plus récemment des systèmes microbioélectrochimiques. Les nanotubes de carbone présentent une réactivité similaire à celles du graphite et peuvent être modifiés de façon covalente par réduction de sel d'aryle diazonium (Bahr et al. 2001, Heald et al. 2004, Abiman et al. 2008, Coates et al. 2012).

La plupart des études sur les propriétés électrochimiques des nanotubes de carbone sont réalisées sur des électrodes de carbone classique (graphite ou carbone vitreux) sur lesquels est déposé un film de nanotubes de carbone. En collaboration avec le Dr Alan Le Goff (Université Joseph Fourier, Grenoble), nous nous sommes intéressés au greffage covalent de d'acides phényles boroniques sur des nanotubes de carbone déposés sur graphite et nous avons étudié l'influence de ce nouveau matériau d'électrode fonctionnalisé sur le développement et les performances de bioanodes microbiennes. Les premiers résultats de cette collaboration font l'objet de ce Chapitre 4, qu'on peut considérer comme un développement du Chapitre 3.

La **première partie** de ce chapitre est consacrée à une brève mise au point bibliographique sur la nature des nanotubes de carbone, sur leurs propriétés électrochimiques et sur leurs applications dans des systèmes microbioélectrochimiques.

La **seconde partie** de ce chapitre présente la procédure de fonctionnalisation par greffage d'acides phényle boroniques sur les nanotubes de carbone.

Enfin, la **troisième partie** est la description et la discussion des premiers résultats de notre étude sur l'effet combiné des nanotubes et de la fonctionnalisation par des acides phényles boroniques sur la connexion d'un biofilm microbien anodophile.

1 Point bibliographique sur les nanotubes de carbone et leur effets sur la connexion de biofilms microbiens anodiques

La découverte des nanotubes de carbone date des années 1980- 1990 (Wiles et Abrahamson 1978, Iijima 1991). Leur utilisation en électrochimie et en électroanalyse a été étudiée rapidement et de façon intensive depuis le début des années 2000 (Britto et al. 1996, Wang 2005). Les nombreuses publications scientifiques sur ce matériau font état de propriétés très intéressantes. Beaucoup ne sont que peu ou pas expliquées et restent sujet à controverse. La brève revue bibliographique qui suit permet de faire le point sur ce qui est connu de ce matériau nanostructuré et de son influence sur les performances de bioanodes microbiennes.

1.1 Propriétés des nanotubes de carbone

Les nanotubes de carbone sont des rouleaux nanométriques de feuillets de graphène. On distingue les nanotubes constitués d'un seul feuillet de graphène enroulé (SWCNTs, single-walled carbon nanotubes) des nanotubes constitués de plusieurs feuillets de graphène formant des rouleaux concentriques (MWCNTs, multiwalled carbon nanotubes). Pour les nanotubes à parois multiples, la distance entre les rouleaux est estimée à 0.33 nm et le diamètre des tubes est compris entre 10 et 50 nm (voir **Figure 1**, ci dessous). Ces nanotubes sont très étudiés en tant que matériau d'électrodes, auquel cas ils sont souvent déposés sous forme de films sur des électrodes plus classique en métal, graphite ou carbone vitreux.

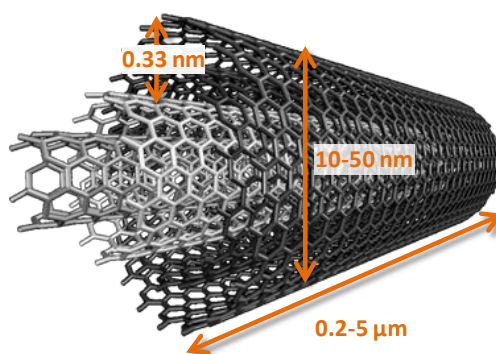


Figure 1 Structure d'un nanotube à paroi multiple (Source : Arkema)

La structure de ces matériaux est en fait très similaire à celle du graphite. Le graphite est en effet constitué de feuillets de graphène plans superposés et avec une distance entre feuillets équivalente à celle des nanotubes de carbone multi parois. Il a été démontré que la réactivité des nanotubes de carbone à parois multiples est en fait très similaire à celui du graphite (Pumera

et al. 2009, Banks et Compton 2006). Pour ces deux matériaux, les auteurs ont démontré qu'il existait deux types de sites réactifs : des sites de type *basal* sur lesquels le transfert électronique hétérogène est lent, des sites de type *edge* sur lesquels le transfert électronique est très rapide. Les sites *basal* sont situés sur les parois des nanotubes de carbone et sur les plans des feuillets de graphite (voir figure). Les sites *edge* sont présents aux extrémités des nanotubes de carbone, sur les bords des feuillets de graphite et dans les défauts de surface des plans *basal*.

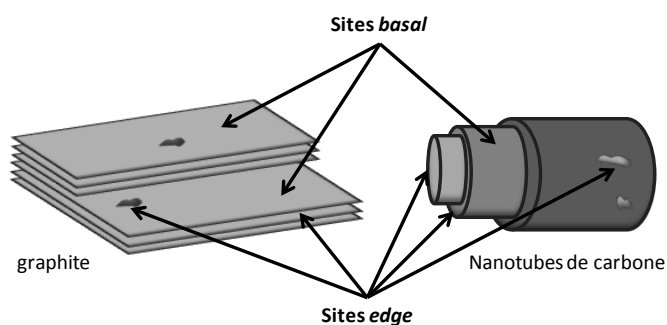


Figure 2 Représentation schématique des sites réactifs du graphite et des nanotubes de carbone

L'essentiel des transferts électroniques hétérogènes est réalisé sur les sites *edge*, que ce soit pour les nanotubes de carbones ou pour le graphite. Plus la densité des sites *edge* est élevée, plus le transfert électronique sur ces matériaux est rapide. Ainsi il existe des différences de comportement entre des nanotubes alignés de façon perpendiculaire au support sur lequel ils sont attachés et des nanotubes dispersés de façon aléatoire (Pumera et al. 2009). Si le graphite et les nanotubes de carbone ont des comportements identiques vis-à-vis du transfert électronique hétérogène, l'intérêt des nanotubes de carbone vient du caractère nanométrique et des différences de topologie de surface que ce matériau peut présenter par rapport au graphite, comme on peut l'apprécier sur les images microscopiques présentées en **Figure 3** ci-dessous.

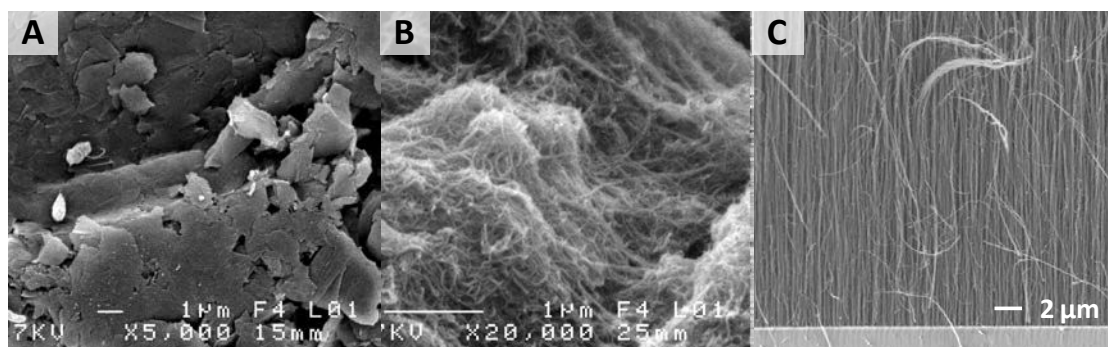


Figure 3 Image de Microscopie Electronique à balayage de surface de graphite (A), de surface de nanotubes de carbone dispersés sur une surface de façon aléatoire (B), de surface de nanotubes en forêt, alignés de façon verticale non étudiés, [source : www.iramis cea.fr](http://www.iramis cea.fr) (C).

Beaucoup de travaux mettent en évidence l'intérêt des nanotubes de carbone comme matériau électrode permettant l'immobilisation de biomacromolécules telles que l'ADN, des ou des protéines. Les nanotubes de carbone sont donc particulièrement étudiés dans les systèmes électrochimiques enzymatiques et dans les biocapteurs (Wang et al. 2005). Les études montrent notamment que les nanotubes de carbone favorisent les transferts électroniques directs entre des enzymes et une électrode, même lorsque le site actif de l'enzyme est protégé à l'intérieur de la structure tridimensionnelle de la protéine. La topographie des nanotubes de carbone a aussi un rôle dans l'immobilisation des macromolécules. Un film de nanotubes déposés sur une électrode peut en effet augmenter la rugosité de surface et présenter des fosses et des cavités, notamment l'intérieur des nanotubes, pouvant héberger ces macromolécules. Dans le domaine des biocapteurs, ces propriétés des nanotubes de carbone permettent notamment d'abaisser les limites de détection, d'abaisser les surtensions des réactions à l'électrode et donc d'augmenter la sensibilité des systèmes. Une controverse existe cependant sur la capacité des nanotubes à électrocatalyser certaines réactions d'oxydation ou de réduction. Cette capacité a longtemps été attribuée aux nanotubes eux-mêmes mais des études récentes ont démontré que ces propriétés étaient dues à la présence de traces métalliques dans les films de nanotubes de carbone (Pumera et al. 2007, 2009). Ces métaux sont utilisés comme catalyseurs lors de la préparation des nanotubes de carbone.

Un enjeu majeur de la recherche dans le domaine de la microbioélectrochimie est l'optimisation du transfert électronique avec des cytochromes membranaires ou avec des médiateurs redox des bactéries. L'amélioration de l'interaction entre électrodes modifiées par des nanotubes de carbone et les macromolécules biologiques présente donc un grand intérêt pour les systèmes microbioélectrochimiques.

1.2 Utilisation des nanotubes de carbone dans des systèmes microbioélectrochimiques

Le développement de biofilms électroactifs anodiques a été testé sur ces nouveaux matériaux carbonés que sont les nanotubes de carbone. Les publications décrivent une amélioration des puissances et des courant délivrés par les biofilms développés sur nanotubes de carbone par rapport aux biofilms développés sur du graphite ou du carbone vitreux. Ces études mettent en évidence plusieurs facteurs permettant l'amélioration des performances. Dans le cas de films de nanotubes de carbone dispersés de façon aléatoire (**Figure 3B**), les études de spectroscopie

électrochimique à impédance montrent une diminution de la résistance au transfert de charge (Tsai et al. 2009, Sun et al. 2010, Zhao et al. 2011). D'autres mesures, comme la voltamétrie cyclique sur les biofilms en absence de substrat, suggèrent que les biofilms microbiens sont connectés de façon plus efficace aux nanotubes de carbone. Ces mesures de voltamétrie cycliques sur les biofilms permettent la détection des molécules redox actives connectant le biofilm à l'électrode, soit des médiateurs excrétés soit des cytochromes membranaires de type c. Peng et al. (2010) détecte une telle molécule redox autour de -0.2 V vs ECS dans un biofilm de *Shewanella oneidensis* dont les caractéristiques laissent penser qu'il s'agit du cytochrome membranaire de type c OmcA. Ils montrent que sur les nanotubes de carbone, les courants faradiques liés à l'oxydoréduction de cette molécule redox sont plus élevés et l'écart entre les pics moins importants. L'augmentation des courants de pic de l'oxydoréduction des cytochromes membranaires du biofilm n'est pas liée à la présence de plus de bactéries sur les nanotubes de carbone comme attesté par les images prises au Microscope Electronique à Balayage (MEB). Cette augmentation des courants faradiques est bien liée à une meilleure connexion du biofilm sur les nanotubes de carbone. Cette meilleure connexion peut être liée à l'augmentation de la rugosité de l'électrode sur lesquels les nanotubes sont déposés. Cette rugosité plus grande peut entraîner une plus grande surface d'interaction avec des molécules redox sécrétées par les bactéries. De plus, la rugosité des nanotubes de carbone peut aussi favoriser la connexion des cytochromes membranaires de la première couche de bactéries en contact direct avec l'électrode. La diminution de l'écart de pics d'oxydoréduction de la molécule connectant le biofilm aux nanotubes de carbone montre que le transfert électronique hétérogène vers l'électrode est plus rapide sur nanotube que sur carbone vitreux. Cette propriété des nanotubes de carbone a été démontré sur des protéines redox (Aigui et al. 2008) et sur d'autres biofilms électroactifs. Ainsi Zhao et al. montrent des résultats similaires à ceux de Peng et al. (2010) en étudiant l'oxydoréduction sur nanotubes de carbone d'un médiateur artificiel de type quinone : les courants faradiques liés à l'oxydoréduction de ce médiateur sont plus élevés et l'écart entre les pics moins importants sur nanotubes de carbone que sur feutre de graphite. De plus, Zhao et al. (2011) observent que l'effet des nanotubes est plus prononcé sur des bactéries connues pour sécréter des médiateurs (*Shewanella oneidensis*, *Pseudomonas aeruginosa*) que sur des bactéries connus pour privilégier un transfert électronique direct (*Geobacter sulfurreducens*).

Une autre étude originale vient corroborer ces observations (Liang et al. 2011). Dans cette étude, les nanotubes n'ont pas servi d'électrode mais ont été incorporés au sein des biofilms en croissance. Cette incorporation permet un développement plus rapide de 30 à 60 h suivant la

concentration en nanotubes de carbone incorporé, des densités de courants et de puissance légèrement plus élevées. Ces meilleures performances sont liées à une résistance au transfert électronique moins élevée à l'anode et qui permet aux bioanodes de conserver des performances stables dans le temps. Des images MEB mettent en évidence la présence de nanotubes incorporés dans le biofilm. Upadhyalula et al. (2009) montrent que les nanotubes de carbone ont la capacité de s'adsorber à la surface de microorganismes. Il semble donc que les nanotubes de carbone se soient liés aux bactéries électroactives et ont ainsi été intégrés dans le biofilm. Cette incorporation aurait alors permis d'augmenter la conductivité du biofilm.

Au-delà de l'amélioration du transfert électronique, d'autres études montrent qu'on peut exploiter une autre propriété intéressante des nanotubes de carbone dans les systèmes microbioélectrochimiques: celle de pouvoir former différentes architectures d'électrodes et augmenter ainsi la surface disponible pour la colonisation. Par exemple, Mink et al. (2012) ont développé une anode en nanotubes de carbone organisés en forme de forêt avec de pics de nanotubes perpendiculaires (voir exemple **Figure 3C**). Cette structure tridimensionnelle possède un rapport surface sur volume élevé et permet la formation d'un biofilm performant délivrant des puissances maximales plus élevées de 26% qu'une électrode de graphite simple.

Pour notre étude, nous nous sommes intéressés aux nanotubes de carbone du point de vue des propriétés électroniques de ce matériau et sans l'objectif d'augmenter la surface disponible pour la colonisation bactérienne. Ces nanotubes sont des matériaux carbonés dont les propriétés de surface peuvent être modulées par greffage électrochimique de sels d'aryle diazonium (Coates et al. 2012, Bahr et al. 2001, Abiman et al. 2008, Heald et al. 2004). Zhao et al. (2011) ont montré brièvement que la modification des propriétés physico-chimiques des nanotubes de carbone par traitement thermique à l'ammoniac permettait d'améliorer de façon supplémentaire les performances des nanotubes de carbone en tant que matériaux d'électrodes. Nous avons cherché à étudier l'influence d'une modification covalente des nanotubes de carbone par des acides phényle boroniques sur les performances de bioanodes microbiennes (voir **Figure 4**). Pour cela nous avons utilisé des nanotubes de carbone à parois multiples (multiwalled carbon nanotubes ou MWCNTs) déposés sur un disque de graphite (dépôts réalisés par Alan Le Goff, Grenoble). La procédure de modification décrite et discuté au Chapitre 3 a été utilisée pour modifier de façon covalente une électrode sur laquelle est déposé un film de nanotubes de carbone. Afin d'évaluer l'effet combiné des nanotubes de carbone et de la modification par les acides phényles boroniques, nous avons comparé les performances de

cette électrode à celles d'une électrode de graphite non modifié, d'une électrode de graphite modifié avec des acides boroniques et d'une électrode en nanotubes de carbone non modifié (voir **Figure 4**).

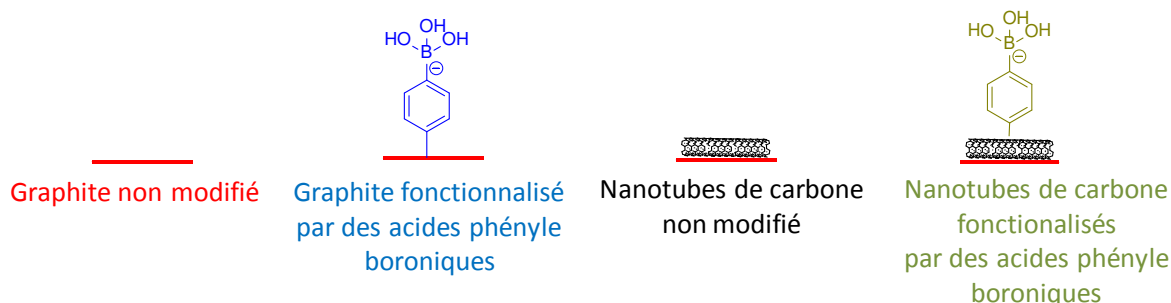


Figure 4 Schéma des électrodes étudiées durant ce chapitre

Ces électrodes ont été étudiées en tant que support de croissance pour des biofilms anodiques microbiens dans cellules électrochimiques où le potentiel de l'anode est contrôlé à 0 V vs Ag/AgCl et la température maintenue à 30°C. (voir schéma en section expérimentale).

2 Etude des films de nanotubes de carbone déposés sur graphite et greffage d'acides phényle boroniques

2.1.1 Caractérisation des films de nanotubes de carbone déposés sur graphite

Avant l'étude des nanotubes dans les systèmes microbioélectrochimiques, nous cherchons à caractériser ce matériau et le comparer avec du graphite en utilisant le ferricyanure comme sonde électrochimique.

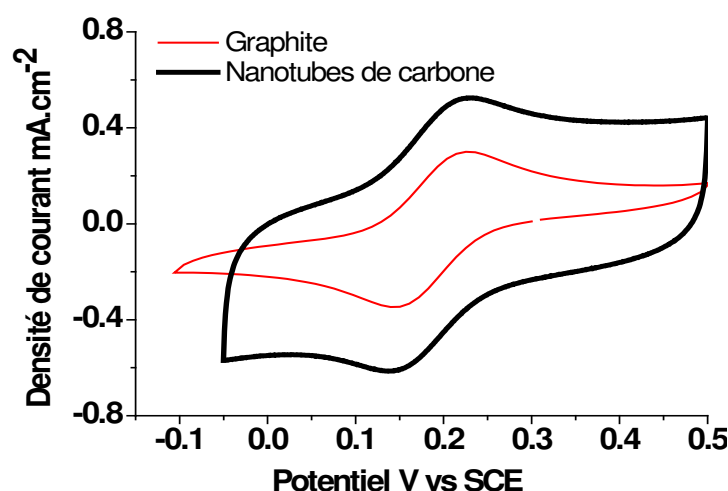


Figure 5 Voltamogrammes de l'oxydoréduction du ferricyanure sur les deux matériaux d'électrodes étudiés et non modifiés. Solution utilisée : 2 mM de ferricyanure de potassium dans KCl 0.1 M et Tampon phosphate pH 7 à 10 mM. Vitesse de balayage : 1 mV.s⁻¹

En mesurant les courants des pics (courants faradiques), on constate que ceux-ci sont pratiquement identiques quelque soit le matériau : 41 μA pour les nanotubes de carbone et 45 μA sur le graphite. Cela voudrait dire que les surfaces électrochimiques sont presque équivalentes sur les deux matériaux. L'intensité des pics de la sonde permet d'estimer la surface électrochimique de l'électrode analysée grâce à l'équation de Randles-Sevcik, appliquée à une solution à température ambiante :

$$i_p = (269000)n^{3/2}AD^{1/2}C\nu^{1/2}$$

- i_p = courant de pic en ampère
- n = nombre d'électrons impliqués dans la réaction d'oxydoréduction, ici 1
- A = surface de l'électrode en cm^2
- D = coefficient de diffusion en cm^2/s (ici $0,76 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)
- C = concentration en mol/cm^3
- ν = vitesse de balayage en V/s

La surface électrochimique calculée pour les disques d'électrodes utilisées dans cette étude est de l'ordre de 0.2 cm^2 , soit très proche de la surface géométrique projetée. En revanche, une différence notable entre les deux matériaux est leur courant capacitif avec 86 μA pour les nanotubes de carbone et 36 μA pour le graphite. Cette augmentation du courant capacitif sur nanotubes de carbone a été observé (Coates et al. 2012) et est lié à l'augmentation de la surface spécifique de l'électrode de nanotubes de carbone poreuse par rapport à une électrode de graphite de même surface projetée. Ce courant capacitif important des nanotubes de carbone pourraient avoir une influence sur la connexion des bactéries, en modifiant les charges de surface présentes à l'interface entre l'électrode et la solution d'électrolyte par exemple.

2.1.2 Etude de la modification des films de nanotubes de carbone

La procédure de modification mise au point et discutée dans le Chapitre 3 est utilisée sur les nanotubes de carbone. Les voltamogrammes de la modification et les caractérisations de transfert électronique hétérogène en utilisant le ferricyanure sont cohérents avec ce qui est observé précédemment sur électrode de graphite.

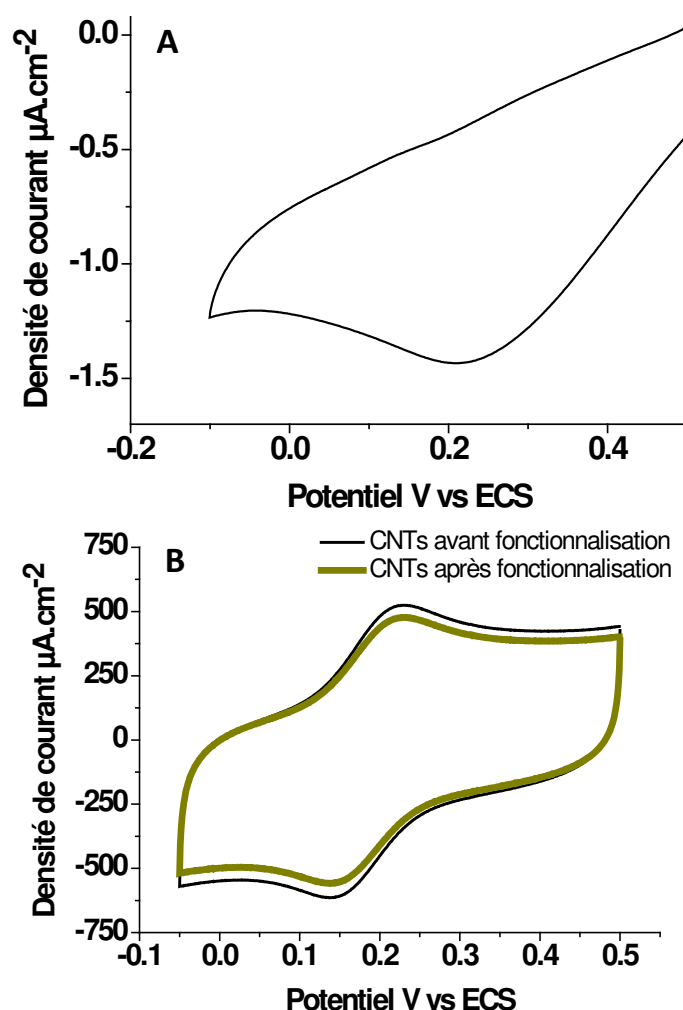


Figure 6 A. Voltamogramme enregistré pendant le greffage d'acides phényle boroniques pinacol ester sur nanotubes de carbone. B. Voltamogrammes de l'oxydoréduction du ferricyanure sur les nanotubes de carbone (CNTs) avant et après fonctionnalisation

Le voltamogramme enregistré durant la modification sur acide boronique montre un pic à environ 0.22 V vs ECS correspondant à la réduction du sel de diazonium (voir **Figure 6A**). Ce pic de réduction est observé à un potentiel légèrement plus élevé que sur graphite, pour lequel la réduction du sel de diazonium à environ 0.1 V vs ECS (voir Chapitre 3). La charge consommée durant la réaction de greffage sur les nanotubes de carbone est de 15.7 mC.cm^{-2} . Une électrode de graphite de même surface projetée a été modifiée pour cette étude ; la charge consommée pour le greffage sur cette électrode de graphite est de 15.3 mC.cm^{-2} .

Après fonctionnalisation complète de la surface, c'est-à-dire après l'étape de déprotection des acides boroniques, on retrouve un voltamogramme d'oxydo-réduction du ferricyanure très proche de celui obtenu sur nanotubes de carbone non modifié (voir **Figure 6B**). Ces voltamogrammes attestent que la fonctionnalisation par les acides phényle boroniques ne

compromet que très peu le transfert électronique hétérogène vers l'électrode en nanotubes de carbone et donc le développement du biofilm anodophile à sa surface.

3 Influence combinée des nanotubes de carbone et des acides phényles boroniques sur les performances d'anodes microbiologiques

Afin d'étudier la connexion d'un biofilm sur l'électrode en nanotubes de carbone, on introduit celle-ci en tant qu'électrode de travail dans une demi-cellule. Il s'agit d'un réacteur à un compartiment contenant l'électrolyte, une électrode de travail sur laquelle le biofilm se développe, une électrode de référence Ag/AgCl et une contre électrode en feutre de graphite connectée par un fil en acier inoxydable. Ce dispositif permet d'appliquer un potentiel constant à l'électrode de travail, soit 0 V vs Ag/AgCl et d'enregistrer le courant délivré par l'électrode de travail. La température des réacteurs est maintenue à 30 ± 3 °C par un bain-marie. L'électrolyte est de la même composition que l'anolyte utilisé dans les piles à combustible microbiologique (composition décrite dans la section expérimentale du Chapitre 2) et est protégé de la lumière par du papier aluminium. La source de bactérie utilisée est de l'anolyte d'expériences antérieures, ce qui permet de garantir dès le départ une forte concentration en bactéries électroactives.

3.1.1 Temps de formation des biofilms

On suit le développement des biofilms grâce au courant délivré par l'électrode après avoir mis en contact l'électrode polarisée avec les bactéries en suspension.

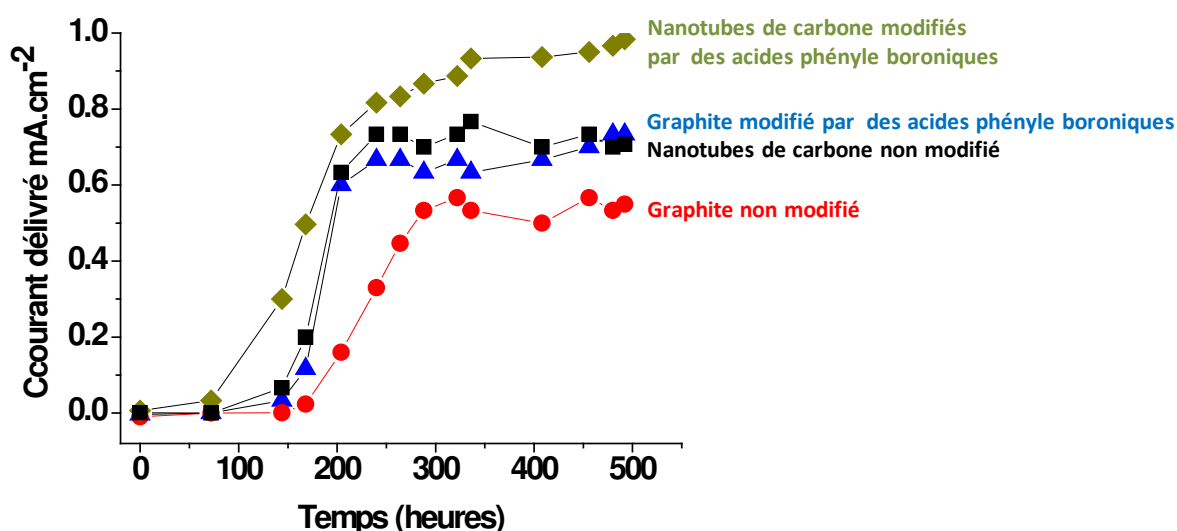


Figure 7 Suivi des courants délivrés par les 4 anodes suivies après leur mise en contact avec un inoculum microbien et imposition d'un potentiel de 0 V vs Ag/AgCl.

Pour les 4 bioanodes étudiées, on observe les phénomènes classiques liés à la mise en place d'un biofilm électroactif. On observe un temps de latence de plusieurs jours, durant lesquels le courant délivré est faible et n'augmente pas ou très peu ; puis on assiste à une augmentation exponentielle du courant délivré correspondant à la connexion et au développement en surface des bactéries électroactives ; enfin le courant atteint un plateau, correspondant à la formation du biofilm efficace sur l'électrode. Le temps nécessaire à la production d'un courant stationnaire est différent sur les quatre électrodes étudiées, montrant un développement du biofilm plus ou moins rapide selon les électrodes. Le biofilm se développe en 300 h sur l'électrode de graphite non modifié et le courant délivré est d'environ 0.5 mA.cm^{-2} en phase stationnaire. Sur l'électrode en nanotubes de carbone ou sur l'électrode de graphite fonctionnalisée par des acides boroniques, le biofilm se développe plus rapidement (200 h). Le temps de formation des biofilms raccourci de 100 h sur électrode de graphite fonctionnalisée par des acides boroniques est en accord avec ce qui a été observé sur des plaques de graphite d'une trentaine de cm^2 (Chapitre 3). En phase stationnaire, le courant délivré par les biofilms développés sur graphite fonctionnalisé par des acides boroniques et sur nanotubes de carbone non fonctionnalisés sont équivalentes (soit environ 0.7 mA.cm^{-2}) et supérieur à celui délivré par le biofilm développé sur graphite non modifié. Sur l'électrode de nanotubes de carbone fonctionnalisés avec des acides phényles boroniques, le biofilm se développe aussi très rapidement en environ 200 h et le courant délivré est supérieur à celui des 3 autres électrodes (près de 0.9 mA.cm^{-2}).

3.1.2 Catalyse de la réduction de l'acétate

Une fois les biofilms développés sur les électrodes, l'électrolyte est changé pour un électrolyte neuf constitué de tampon phosphate 20 mM à pH 7 et d'acétate en concentration non limitante (20mM) afin d'évaluer les performances de chaque bioanode par voltamétrie cyclique.

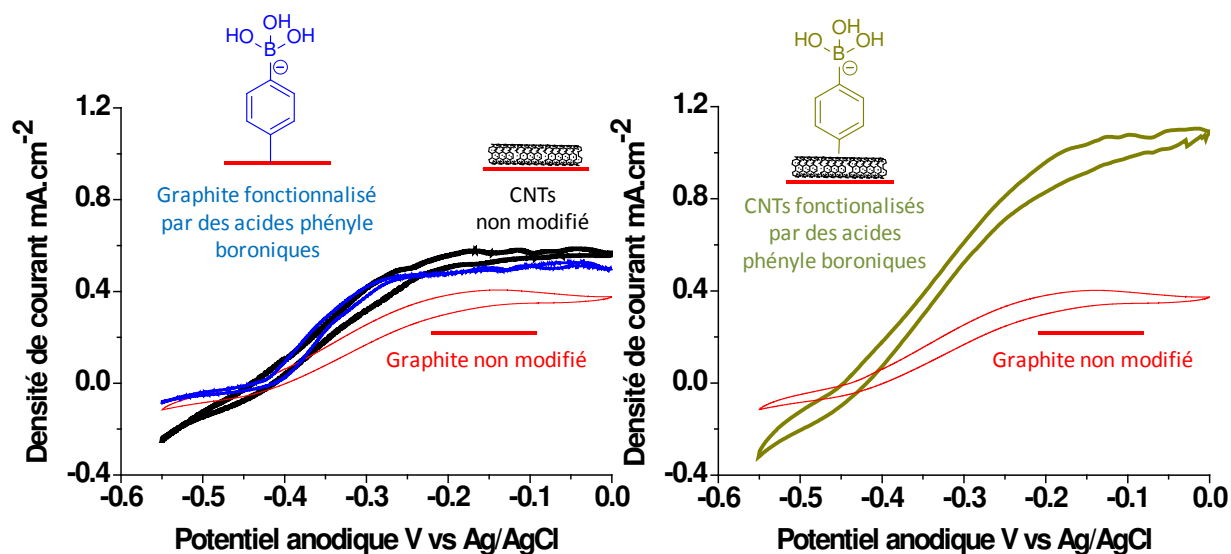


Figure 8 Oxydation de l'acétate étudié par voltamétrie cyclique sur les 4 bioanodes étudiées en présence d'une concentration non limitante d'acétate (20 mM). Vitesse de balayage : 1 mV.s^{-1} .

On constate que la catalyse des biofilms sur nanotubes de carbone et sur graphite modifié par des acides phényles boroniques est plus efficace que celle du biofilm sur graphite. Les courants de plateau mesurés sur les voltamogrammes sont proches de ceux délivrés lorsque les réacteurs ont atteint leur état stationnaire. Ainsi, les biofilms établis sur nanotubes de carbone et sur graphite modifié par des acides phényles boroniques délivrent des courants catalytiques 1.4 fois plus important que le biofilm connecté à l'électrode de graphite non modifié (**Figure 8**, gauche), en accord avec les résultats du Chapitre 3 précédent. De plus, bien que l'augmentation du courant due à l'oxydation de l'acétate commence au même potentiel pour les deux biofilms, on observe que la pente du courant d'oxydation est plus importante pour les biofilms sur nanotubes de carbone, suggérant une meilleure connexion des biofilms sur cette surface et/ou un meilleur transfert électronique hétérogène. La capacité des électrodes en nanotubes de carbone à améliorer le transfert électronique hétérogène est en accord les travaux publiés dans la littérature, à la fois sur systèmes électrochimiques enzymatiques et sur les systèmes électrochimiques microbiens (voir partie 1 de ce chapitre). L'amélioration des performances sur graphite modifié par des acides phényle boroniques a été discutée dans le Chapitre 3. Une explication probable est l'amélioration de l'adhésion des bactéries électroactives sur les électrodes grâce à une interaction entre les acides boroniques greffés et les lipopolysaccharides de la membrane bactérienne externe.

Sur nanotubes de carbone fonctionnalisés avec des acides boroniques (**Figure 8**, droite), on constate une amélioration plus significative des performances de la bioanode avec des densités de courant catalytiques :

- environ 2 fois supérieures à ce qui est observé sur l'électrode de graphite fonctionnalisée par des acides phényles ou par des nanotubes de carbone non modifiés. (**Figure 8**, gauche)
- environ 3 fois supérieures à ce qui est observé sur graphite non modifié. (**Figure 8**, droite)

Il est très intéressant de constater que l'amélioration des performances sur cette électrode est supérieure à l'amélioration des performances sur nanotubes de carbone seuls et à l'amélioration des performances liées aux acides boroniques seuls. Il semblerait donc qu'il y ait un effet de synergie des nanotubes et des acides phényles boroniques sur la catalyse de l'oxydation de l'acétate par le biofilm développé. Une autre explication serait que la densité d'acides phényle boroniques greffée soit plus importante sur les nanotube de carbone que sur graphite pour une surface projetée égale et sans gêner le transfert électronique. Cette hypothèse est cohérente avec les résultats de Coates et al. 2012. Ces travaux comparent le greffage d'éthynylferrocène sur des nanotubes de carbone à paroi unique et sur du carbone vitreux par combinaison de greffage électrochimiques de sels de diazonium et de *click chemistry*. Le taux de recouvrement de la modification testée sur nanotube de carbone est entre 1.6 et près de 2 fois supérieure au taux de recouvrement de la modification sur graphite. Il est cependant difficile de transposer ces résultats à nos travaux car le greffage dépend de la nature des nanotubes (simple ou multi-parois) et du diamètre des tubes (Bahr et al. 2001).

L'aspect des biofilms microbiens formés a également été étudié par imagerie MEB.

3.1.3 Aspects des biofilms microbiens

Nous avons choisi la Microscopie Electronique à Balayage afin d'obtenir des images des biofilms développés sur les quatre électrodes étudiées. Des images en coupe des biofilms (voir **Figure 9**) ont permis d'évaluer leur épaisseur.

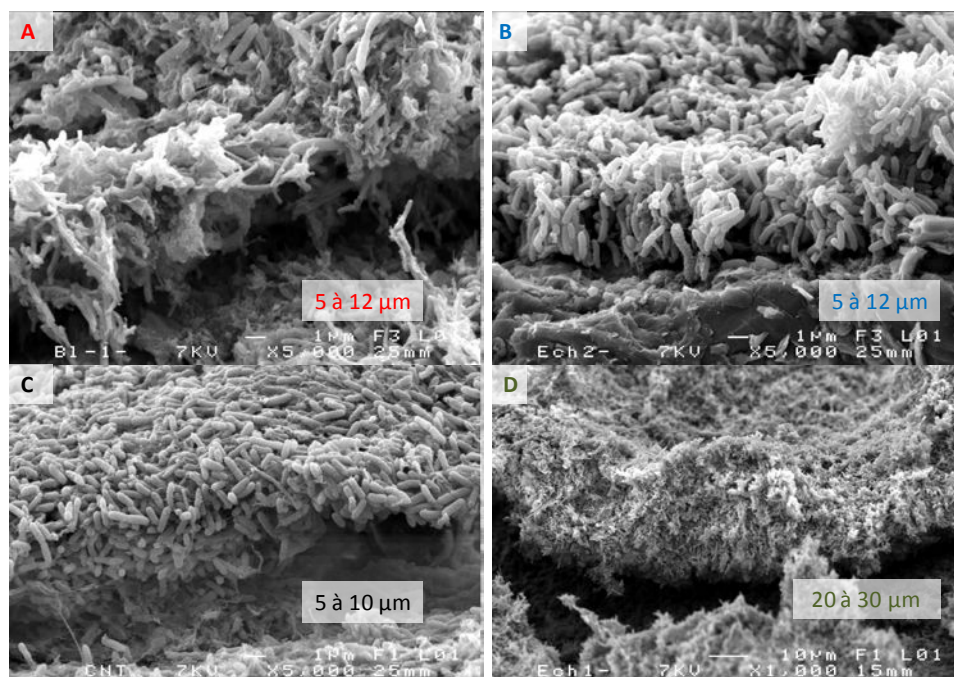


Figure 9 Images MEB des biofilms développés sur les différentes électrodes étudiées : (A) graphite non modifié, (B) acides phényle boroniques greffés sur graphite, (C) nanotubes de carbone, (D) acides phényle boroniques greffés sur nanotubes de carbone. Pour les images ABC, grossissement x 5000. Pour l'image D, grossissement x 1000

Nous constatons que les biofilms développés sur graphite non modifié, graphite modifié par des acides phényles boroniques et nanotubes de carbone non modifiés ont des épaisseurs équivalentes. Ces observations sont en accord avec les études de biofilms développés sur nanotubes de carbone dispersé de façon aléatoire qui montrent que les meilleures performances sur nanotubes de carbone ne sont pas corrélées à des différences de colonisation bactérienne (Zhao et al. 2011, Liang et al. 2011, Peng et al. 2010). Ces meilleures performances sont attribuées à une amélioration du transfert électronique hétérogène sur la surface de l'électrode. Ces observations rejoignent également celles faites au Chapitre 3, où les différences d'épaisseurs des biofilms développés sur graphite modifié par des acides phényle boroniques et des biofilms développés sur graphite non modifié étaient très légères. De plus, on constate de nouveau l'orientation perpendiculaire des bactéries colonisant cette surface, phénomène discuté dans le Chapitre 3.

Dans le cas des bioanodes développées sur nanotubes de carbone fonctionnalisés par des acides phényles boroniques, leur épaisseur est 2 à 4 fois supérieure à celles observées sur les 3 autres électrodes. Cette quantité de bactéries plus importante sur cette anode est corrélée aux densités de courant d'oxydation catalytiques de l'acétate qui sont doublées voire triplées sur cette surface (**Figure 8**, droite).

Conclusion

La fonctionnalisation de nanotubes de carbone par des acides phényles boroniques permet d'augmenter de façon significative les performances des bioanodes. L'amélioration observée est supérieure à l'effet des nanotubes de carbone seuls ou à l'effet des acides boroniques greffés seuls. Il y aurait donc un effet synergique dans la combinaison de ces deux modifiants. L'augmentation des performances de la bioanodes développée sur les nanotubes de carbone fonctionnalisés par des acides boroniques correspond à une augmentation de la colonisation bactérienne sur l'électrode.

L'amélioration des performances des systèmes bioélectrochimiques sur nanotubes de carbone serait liée à un meilleur transfert électronique hétérogène sur ce matériau carboné. Or, il a été démontré que ce transfert électronique rapide est lié aux sites *edge* des nanotubes de carbone. On peut cependant imaginer que dans le cas de systèmes bioélectrochimiques tels que les bioanodes qui impliquent l'immobilisation d'entités de grande taille et vivantes, d'autres caractéristiques des nanotubes de carbone influencent les performances. Ces caractéristiques peuvent être liées par exemple à l'architecture des films de nanotubes et de la surface spécifique qu'ils offrent notamment pour des médiateurs excrétés par les bactéries.

Il serait alors intéressant de tester cette même procédure de fonctionnalisation sur du graphite contenant une grande densité de sites *edge* tels que le graphite pyrolytique coupé dans le plan des sites *edge* (Edge-Plane Pyrolytic Graphite). Contrairement aux nanotubes de carbone, cette forme particulière de graphite présente une surface spécifique équivalente à celle d'un matériau de graphite classique.

Section expérimentale

Fabrication des électrodes

Les électrodes en nanotubes de carbone ont été préparées par Dr Alan Le Goff (collaboration Université Joseph Fourier de Grenoble). La préparation est adaptée de la méthode décrite par Wu et al. 2004. 10 mg de nanotubes de carbone multi-parois de 9.5 nm de diamètre (Nanocyl) et d'une grande pureté ont été dispersés dans 250 mL d'eau pure et passés au sonicateur pendant 30 minutes. La solution est décantée pendant une nuit. Le surnageant (80 mL) est alors filtré sur des filtres en nitrate de cellulose (Sartorius, 0.45 μm , diamètre de 3.5 cm) entraînant la formation d'un dépôt d'environ 0.02 mg de nanotubes de carbone. Les membranes sont alors déposées sur des disques de graphite d'une surface d'environ 0.2 cm^2 (extrémité d'un barreau de graphite de 0.5 cm de diamètre). Les membranes sont ensuite dissoutes par de l'acétone et les électrodes sont chauffées à 100°C pendant 5 h.

Les expériences sont ensuite réalisées sur des disques d'électrodes de 0.2 cm^2 . Il s'agit en réalité de barreaux de graphite dont le pourtour est isolé par des gaines thermo-rétractables en plastique isolant, ne laissant que le disque de l'extrémité accessible.

Dispositifs microbioélectrochimiques

Les dispositifs utilisés sont des cellules électrochimiques à 3 électrodes. L'électrode de travail est un disque de graphite non modifié, de nanotubes non modifié, de graphite fonctionnalisé par des acides phényle boroniques ou de nanotubes de graphite fonctionnalisés par des acides phényle boroniques. On impose à cette électrode de travail un potentiel de 0 V rapport à une électrode de référence Ag/AgCl (solution de KCl saturé). La contre électrode est une électrode en feutre de graphite connectée à un fil d'acier inoxydable. Les cellules électrochimiques sont recouvertes d'aluminium afin de les protéger de la lumière et sont maintenues à 30 ± 3 °C par un bain-marie.

L'électrolyte a la même composition que l'anolyte décrit dans les chapitres 2 et 3. L'inoculum est un mélange d'eaux usées venant de la station d'épuration de Beaurade et d'ancien anolyte. Une fois que les biofilms anodiques sont développés, l'électrolyte est remplacé par du tampon phosphate pH 7 à 20 mM contenant de l'acétate de potassium (20 mM). Les performances des bioanodes sont mesurées dans ce nouveau milieu.

Références du Chapitre 4

A

Agüí L., Yanez-Sedeno P., Pingarron J. M.
Analytica Chimica Acta **622**, 2008, 11-47
"Role of carbon nanotubes in electroanalytical chemistry. A review"

Abiman P., Wildgoose C. G., Compton R. G.
International Journal of Electrochemical Science **3**, 2008, 104-117
"Investigating the mechanism for the covalent chemical modification of multiwalled carbon nanotubes using aryl diazonium salts"

B

Bahr J. L., Yang J., Kosynkin D. V., Bronikowski M. J., Smalley R. E., Tour J. M.
Journal of the American Society **123**, 2001, 6536-6542
"Functionalization of carbon nanotubes by electrochemical reduction of aryl diazonium salts: a bucky paper electrode"

Banks C. E., Compton R. G. C.
Analyst **131**, 2006, 15-21
"New electrodes for old: from carbon nanotubes to edge plane pyrolytic graphite"

C

Coates M., Griveau S., Bedioui F., Nyokong T.
Electroanalysis **24**, 2012, 1833-1838
"Layer by layer electrode surface functionalisation using carbon nanotubes, electrochemical grafting of azide-alkyne functions and click chemistry"

H

Heald C. G. R., Wildgoose G. G., Jiang L., Jones T. G. J., Compton R. G. C.
Physical Chemistry and Chemical Physics **5**, 2004, 1794-1799
"Chemical derivatization of multiwalled carbon nanotubes using diazonium salts"

L

Liang P., Wang H., Xia X., Huang X., Mo Y., Cao X., Fan M.
Biosensors and Bioelectronics **26**, 2011, 3000-3004
"Carbon nanotubes powders as electrodes modifier to enhance the activity of anodic biofilm in microbial fuel cells"

M

Mink J. E., Rojas J. P., Logan B. E., Hussain M. M.
Nanoletters **12**, 2012, 791-796
"Vertically grown multiwalled carbon nanotubes anode and nickel silicide integrated high performance micro-sized (1.25 μ L) microbial fuel cell"

P

Peng L., You S. J., Wang J. Y.
Biosensors and Bioelectronics **25**, 2010, 1248-1251
"Carbon nanotubes as electrode modifier promoting direct electron transfer from *Shewanella oneidensis*"

Pumera M.

Langmuir **23**, 2007, 6453-6458

"Carbon nanotubes Contain Residual Metal Catalyst Nanoparticles Even after Washing with Nitric Acid at Elevated Temperature Because These Metal Nanoparticles Are Sheathed by Several Graphene Sheets"

Pumera M.

Chemistry, a European Journal **15**, 2009, 4970-4978

"The electrochemistry of carbon nanotubes: Fundamentals and applications"

S

Sun J. J., Zhao H. Z., Yang Q. Z., Song J., Xue A.

Electrochimica Acta **55**, 2010, 3041-3047

"A novel layer-by-layer self-assembled carbon nanotubes-based anode: preparation, characterization, and application in microbial fuel cell"

I

Tsai H. Y., Wu C. C., Lee C. Y., Shih E. P.

Journal of Power Sources **194**, 2009, 199-205

"Microbial fuel cell performance of multiwall carbon nanotubes on carbon cloth as electrodes"

W

Wang J.

Electroanalysis **17**, 2005, 7-14

"Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: A review"

Wu Z., Chen Z., Du X., Logan J. M., Sippel J., Nikolou M., Kamaras K., Reynolds J. R., Tanner D. B., Hebard A. F., Rinzler A. G.

Science **305**, 2004, 1273-1276

"Transparent, conductive carbon nanotube films"

Z

Zhao Y. Watanabe K., Hashimoto K.

Physical Chemistry and Chemical Physics **13**, 2011, 15016-15021

"Hierarchical micro/nano structures of carbon composites as anodes for microbial fuel cells"

Chapitre 5

Etude de modifications de surface pour des biocathodes microbiennes

Sommaire

Introduction	222
1 Rappels bibliographiques sur les biocathodes microbiennes.....	223
1.1 Catalyse microbienne de la réduction du dioxygène dans des piles à combustible microbiologiques.....	224
1.2 Electrosynthèse microbienne d'acides organiques à partir de la réduction de CO ₂	227
2 Effet du greffage de sels d'aryle diazonium chargés positivement sur les performances d'un biofilm catalysant la réduction du dioxygène dans une pile à combustible microbiologique	229
2.1 Procédure de modification et caractérisation des électrodes modifiées	230
2.1.1 <i>Procédure de modification.....</i>	<i>230</i>
2.1.2 <i>Caractérisation du transfert électronique hétérogène entre la surface modifiée et le ferricyanure de potassium</i>	<i>231</i>
2.2 Etude de la phase de développement des biocathodes microbiennes	233
2.2.1 <i>Courbes de polarisation</i>	<i>234</i>
2.2.2 <i>Catalyse de la réduction du dioxygène</i>	<i>235</i>
2.2.3 <i>Molécules électroactives détectées par voltamétrie cyclique</i>	<i>237</i>
2.2.4 <i>Bilan</i>	<i>239</i>
2.3 Caractérisation des biocathodes développées	239
2.3.1 <i>Courbes de polarisation</i>	<i>239</i>
2.3.2 <i>Catalyse efficace de la réduction du dioxygène mise en évidence par voltamétrie cyclique</i>	<i>241</i>
2.3.3 <i>Molécules électroactives détectées par voltamétrie cyclique</i>	<i>243</i>
2.3.4 <i>Biofilms microbien observés par Microscopie Electronique à Balayage (MEB).</i>	<i>245</i>
2.4 Bilan	247
3 Effet du greffage de sels d'aryle diazonium sur les performances de biofilms cathodiques homoacétogènes dans des électrolyseurs microbiens	249
3.1 Etude de la procédure de modification sur feutre de graphite	250

3.1.1	<i>Caractérisation des électrodes non modifiées</i>	250
3.1.2	<i>Fonctionnalisation avec un groupement positif</i>	251
3.1.3	<i>Fonctionnalisation avec des acides boroniques</i>	253
3.2	Premiers résultats d'électrosynthèse microbienne sur les feutres fonctionnalisés .	255
3.2.1	<i>Dispositifs utilisés et mesures effectuées</i>	255
3.2.2	<i>Performances des électrolyseurs à cathodes non modifiées</i>	257
3.2.3	<i>Comparaison des performances des électrolyseurs à cathodes modifiées</i>	258
Conclusion		261
Section expérimentale		262
Biocathodes réduisant le dioxygène		262
	<i>Dispositifs utilisés</i>	262
	<i>Mesures effectuées</i>	262
Biocathodes réduisant le CO ₂ en acides organiques		263
	<i>Dispositifs utilisés</i>	263
Références du Chapitre 5		265

Introduction

L'existence de biofilms microbiens catalysant les réactions de réduction à la cathode de systèmes microbioélectrochimiques montrent que les associations entre des bactéries électroactives et des électrodes sont diverses et très complexes. Leur découverte étant plus récente que celles des biofilms microbiens anodiques, leur fonctionnement est encore peu compris et les performances de ces systèmes sont faibles. Une partie de ce travail de thèse a été consacrée à comprendre et à améliorer la connexion de deux types de biofilm microbiens cathodiques en changeant les propriétés de surface des électrodes par greffage de sels d'aryle diazonium. Ces travaux préliminaires font l'objet de ce Chapitre 5. Pour ces premiers travaux, nous avons donc choisi de tester des modifications qui se sont révélées bénéfiques pour les performances de bioanodes catalysant l'oxydation de l'acétate.

La **première partie** de ce Chapitre permettra de rappeler les enjeux et les intérêts des biocathodes microbiennes des deux types de biofilms microbiens étudiés ici : les biofilms catalysant la réduction du dioxygène dans des piles à combustible microbiologiques et les biofilms réduisant le CO₂ en acides organiques dans des électrolyseurs microbiens.

La **seconde partie** est consacrée à l'étude des performances des biocathodes réduisant le dioxygène à haut potentiel. Une modification de surface a été testée sur ce type de biocathodes, il s'agit du greffage covalent de fonctions triphényle phosphonium par réduction de sels d'aryle diazonium.

La **troisième partie** est l'étude des performances de biocathodes homoacétogènes catalysant la réduction de CO₂ en acides organiques. Sur ces cathodes, deux modifications de surface par réduction de sels d'aryle diazonium ont été testées : le greffage de fonctions triméthyle ammonium chargées positivement, et le greffage de fonctions acides boroniques capables de se complexer avec les glucides des membranes bactériennes.

1 Rappels bibliographiques sur les biocathodes microbiennes

Les réactions de réduction catalysées par des biofilms cathodiques sont extrêmement nombreuses. Leur découverte est très récente par rapport aux biofilms anodiques. On peut recenser les premières biocathodes réduisant le dioxygène en 1997 (Erable et al. 2012), et les dernières biocathodes découvertes sont les cathodes réduisant le CO₂ en acides organiques en 2010 (Nevin et al. 2010). La catalyse microbienne des réactions de réduction par les systèmes microbioélectrochimiques permet d'envisager des applications spécifiques et variées notamment pour la dépollution/ bioremédiation de polluants spécifiques ou encore pour la production de molécules à forte valeur ajoutée. Si beaucoup de consortiums bactériens capables de catalyser des réactions de réduction ont été découverts récemment, les performances des biocathodes étudiées sont souvent faibles ou difficilement reproductibles ce qui ne permet pas pour le moment leurs applications industrielles. Les principales difficultés rencontrées dans le domaine des biofilms cathodiques sont :

- L'identification des espèces bactériennes ou de consortiums microbiens et les mécanismes métaboliques impliqués dans la catalyse
- L'adhésion et la connexion de biofilms épais et stables

Afin de comprendre les mécanismes métaboliques impliqués dans les réactions à la cathode, des études de biologie moléculaire (notamment génomiques) sont nécessaires. Or, ce type d'études requiert l'identification d'une ou plusieurs espèces modèles qui, selon la réaction de réduction étudiée, ne sont pas encore forcément connues. De plus, l'adhésion et la connexion des biofilms sont les phénomènes clés conditionnant les performances des biofilms microbiens. Or, les études publiées jusqu'à maintenant n'ont pas permis d'identifier les paramètres clés influençant la formation des biofilms cathodiques. Parmi ces paramètres, nous nous sommes intéressés à l'interaction entre les bactéries et la surface des cathodes. Notre stratégie est de moduler les propriétés physico-chimiques des surfaces de cathodes afin de promouvoir l'adhésion et la connexion des biofilms à leur surface.

Nous nous sommes intéressés à deux types de biofilms cathodiques distincts : des biocathodes réduisant le dioxygène dans des piles à combustibles microbiologiques et des biocathodes réduisant le CO₂ en acides organiques dans des électrolyseurs microbiens. Pour ces deux types de biofilms, la maturité de la recherche, les applications, les espèces bactériennes impliquées et leur mise en œuvre dans des cathodes sont très différentes. C'est pourquoi les

enjeux de la recherche pour chacun de ces deux types distincts de biocathode sont discutés ci-après successivement.

1.1 Catalyse microbienne de la réduction du dioxygène dans des piles à combustible microbiologiques

L'utilisation de la réduction du dioxygène à la cathode de systèmes microbioélectrochimiques est un enjeu commun et très étudié dans le domaine général des piles à combustible. L'intérêt de cette réaction est qu'elle fait intervenir un oxydant renouvelable, largement disponible et dont le potentiel thermodynamique de réduction en eau est très élevé (réduction à quatre électrons de O_2 en H_2O) :

- en milieu acide (pH 0) : $O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightleftharpoons 2H_2O$ (0.985 V vs ECS)
- en milieu basique (pH 14) : $O_2 + 2H_2O + 4e^- \rightleftharpoons 4OH^-$ (0.157 V vs ECS)

Ce potentiel cathodique élevé est particulièrement intéressant dans le contexte de la production électrique car il assure une différence de potentiel élevée pour une pile. En revanche, la réduction du dioxygène sur la plupart des matériaux d'électrodes et notamment sur les électrodes carbonées est fortement limitée par les surtensions des réactions à l'électrode. Ces surtensions rendent la cinétique de la réaction réduction du dioxygène lente ou incomplète. Sur ces matériaux, une autre voie de réduction du dioxygène que la réduction à 4 électrons prédominerait (Kinoshita 1992), il s'agit de la voie des peroxydes (à 2 électrons) dont le potentiel thermodynamique est plus bas que celui de la réduction du dioxygène à 4 électrons :

- en milieu acide : $O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons H_2O_2$ (0.426 V vs ECS)
puis $H_2O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons 2H_2O$ (1.520 V vs ECS)
- en milieu basique : $O_2 + H_2O + 2e^- \rightleftharpoons HO_2^- + OH^-$ (-0.309 V vs ECS)
puis $HO_2^- + H_2O + 2e^- \rightleftharpoons 3 OH^-$ (0.623 V vs ECS)

Si on veut pouvoir exploiter de façon efficace la réduction de dioxygène à la surface des cathodes, il est nécessaire d'utiliser des catalyseurs. La découverte que des biofilms catalysant la réduction du dioxygène pouvaient se développer sur des cathodes à partir d'une source de bactéries mixtes date de 1997. Depuis le nouvel essor de la recherche dans le domaine des piles à combustible microbiologiques, de nombreuses études ont été réalisées sur ces biofilms

particuliers. Ces travaux ont permis d'apporter des premiers éléments dans la compréhension des biocathodes à oxygène mais il reste de nombreuses interrogations.

Tout d'abord, les conditions optimales pour le développement rapide de biocathodes n'ont pas été trouvées. Ces biofilms sont souvent fragiles, lents à se former ou alors la catalyse des biofilms formés sur les cathodes n'est pas très efficace (courants faibles et/ou très peu de diminution de la surtension de réduction du dioxygène par rapport à une cathode abiotique). De nombreux procédés de développement de biocathodes sont décrits dans la littérature mais aucune stratégie réellement efficace permettant le développement de biocathode performantes n'émerge. La diversité des procédés tient aux différents paramètres énumérés ci-dessous :

- des sources d'inoculum différents : boues de stations d'épuration, de l'eau de mer, du terreau, des sédiments de rivière, des biofilms récupérés sur des matériaux corrodés
- des conditions de développement différents : des cathodes connectées à une anode par une résistance externe (30 à 1000 Ω), des cathodes à potentiel imposé (-0.345 à +0.197 V vs ECS), la présence ou non d'une boucle de recirculation du catholyte
- des nutriments fournis et donc la favorisation de métabolismes autotrophes, hétérotrophes ou partiellement autotrophes.

Les mécanismes de fonctionnement des biocathodes développées sont difficiles à étudier, en particulier les associations possibles de métabolisme microbiens impliqués dans la catalyse de la réduction du dioxygène. En effet, les biofilms étudiés comportent une diversité impressionnante de bactéries (Chen et al. 2008 et 2010, Aldrovandi et al. 2009, Rabaey et al. 2008, Lyautey et al. 2011, Zhang et al. 2011). Aucune espèce n'a encore émergé comme étant dominante ou commune aux différentes biocathodes étudiées. Il n'existe donc pas de bactérie modèle pour des études approfondies du métabolisme et du transfert électronique se déroulant dans les biocathodes à dioxygène. Certaines recherches ont été entreprises sur des cultures pures de bactéries isolées à partir de biofilms cathodiques (Rabaey et al. 2008, Erable et al. 2010, Freguia et al. 2010, Lyautey et al. 2011, Zhang et al. 2011). Ces études mettent en évidence que les performances des espèces isolées sont très inférieures à celles de biofilms mixtes. Cette observation suggère que la catalyse de la réduction du dioxygène est liée à des associations syntrophiques entre plusieurs espèces microbiennes dans les biofilms mixtes. Une étude a été réalisée avec une culture pure d'*Acidithiobacillus ferrooxidans*, une espèce bactérienne isolée de drainage minier et se développant en milieu très acide (Carbajosa et al. 2010). Il s'agit d'une espèce qui pourrait s'ériger en modèle mais ses conditions de croissance (pH 2) ne reflètent pas

ce qui se déroule dans des biofilms formés à partir d'inoculum naturels et fonctionnant à pH neutre.

Un moyen de comparer l'efficacité de la catalyse de la réduction du dioxygène est d'utiliser la voltamétrie cyclique. La voltamétrie cyclique permet de comparer le potentiel auquel débute la réduction du dioxygène à la cathode avec le potentiel thermodynamique de réduction du dioxygène (0.57 V vs ECS à pH 7). Parmi les voltamogrammes publiés montrant la catalyse de la réduction du dioxygène par des microorganismes, on observe une disparité des performances obtenues. Dans beaucoup d'études, notamment réalisées sur des cultures pures, on observe des surtensions élevées des réactions sur la cathode et des courants délivrés faibles (Freguia et al. 2010, Erable et al. 2010, Lyautey et al. 2011). La catalyse efficace du dioxygène permet d'observer des densités de courant s faibles mais significatives. E plus, les potentiels de seuil de la réduction du dioxygène sont trop bas (surtension supérieure à 600 mV) pour que l'utilisation de ces biocathodes soit intéressante pour la production d'électricité. De plus, dans beaucoup d'études de voltamétrie cyclique, les bactéries utilisées ne forment pas un biofilm mais sont simplement adsorbées en surface de la cathode étudiée.

On ne dénombre que peu d'études montrant une catalyse débutant à haut potentiel. La catalyse de la réduction du dioxygène par une culture pure de *A. ferrooxidans* débute à 0.045 V vs ECS mais cette réduction se déroule à pH 2. A ce pH, le potentiel thermodynamique de la réduction du dioxygène à 4 électrons est de 0.87 V vs ECS. Le biofilm ne permet donc pas une baisse des surtensions importante de la réaction à l'électrode. Ter Heijne et al. (2010) sont les premiers et les seuls chercheurs à publier une catalyse efficace de la réduction du dioxygène par un biofilm mixte à pH 7. Pour ces biofilms, la catalyse de la réduction du dioxygène débute +0.3 V vs ECS équivalents aux potentiels de la réduction du dioxygène sur des catalyseurs métalliques performants (par exemple le platine, environ 0.25 V vs ECS à pH 7). A notre connaissance, le seul autre exemple de catalyse efficace est celui des biocathodes développés lors d'une collaboration entre notre laboratoire et le laboratoire de Technologie Environnementale de Wageningen. Cette collaboration a fait l'objet d'une publication sur l'influence du pH et de la température sur les performances de biocathodes à oxygène (Strik et al. 2013). Les voltamogrammes (non publiés dans l'article) montrent une catalyse de la réduction du dioxygène débutant à un potentiel très élevé, soit environ +0.34 V vs ECS à pH 7.

Les études sur les biofilms cathodiques réduisant le dioxygène mettent en évidence plusieurs limites des biofilms cathodiques. La diffusion du dioxygène vers les microorganismes

électroactifs est une des limites majeures de ce type de biocathodes. Ce problème de la diffusion du dioxygène est en réalité un problème commun et récurrent des procédés utilisant le dioxygène (piles à combustible abiotiques mais aussi procédé d'épuration des eaux usées par boues activées par exemple). Ce problème est lié à la faible solubilité du dioxygène dans l'eau évaluée à environ 7mg/L (Kinoshita et al. 1992). Dans des biofilms microbiens cathodiques, le problème est d'autant plus important que le dioxygène doit atteindre les bactéries dans l'épaisseur du biofilm. Une autre limite des biocathodes microbienne à oxygène a été identifiée, il s'agit de la connexion du biofilm à l'électrode. L'influence des propriétés de surface des cathodes sur la colonisation et les performances des biocathodes ont été démontré dans quelques articles. Par exemple, De Schamphelaire et al. (2010) montrent que les biocathodes développées sur de l'acier inoxydable et celles développées sur du graphite ne sont pas composés des mêmes bactéries. De plus, Erable et al. (2010) ont montré qu'une biocathode se développe plus rapidement et délivre un courant plus élevé sur une électrode en acier inoxydable rugueuse que sur une électrode en acier lisse. La rugosité peut permettre d'augmenter la surface disponible pour la colonisation ou pour le transfert électroonique hétérogène avec des médiateurs redox excrétés. L'augmentation de la rugosité peut aussi avoir des conséquences sur les interactions faibles entre la surface de l'électrode et les bactéries en suspension et promouvoir l'adhésion d'un biofilm microbien.

L'autre type de biocathode étudié au cours de ce travail de thèse est la biocathode à électrosynthèse, générant des acides organiques à partir de CO₂. Il s'agit d'un procédé microbien récent et un rappel bibliographique y est consacré dans le paragraphe suivant.

1.2 Electrosynthèse microbienne d'acides organiques à partir de la réduction de CO₂

Le premier dispositif d'électrosynthèse microbienne de composés organiques (**Figure 1**) a été découvert et publié par Nevin et al. (2010). Il s'agit d'une étude prouvant le concept de la catalyse de la réduction de CO₂ en acides organiques par l'espèce microbienne acétogène *Sporomusa ovata*. Les acétogènes sont des microorganismes de type anaérobie capables de produire de l'acétate à partir de dihydrogène et de CO₂. Nevin et al. ont observé que *S. ovata* est capable de former un biofilm peu épais. Dans ce dispositif microbioélectrochimique *S. ovata* emploie un métabolisme litho-autotrophe car la cathode polarisée sert de donneur d'électrons et la source de carbone est le CO₂ (composé inorganique).

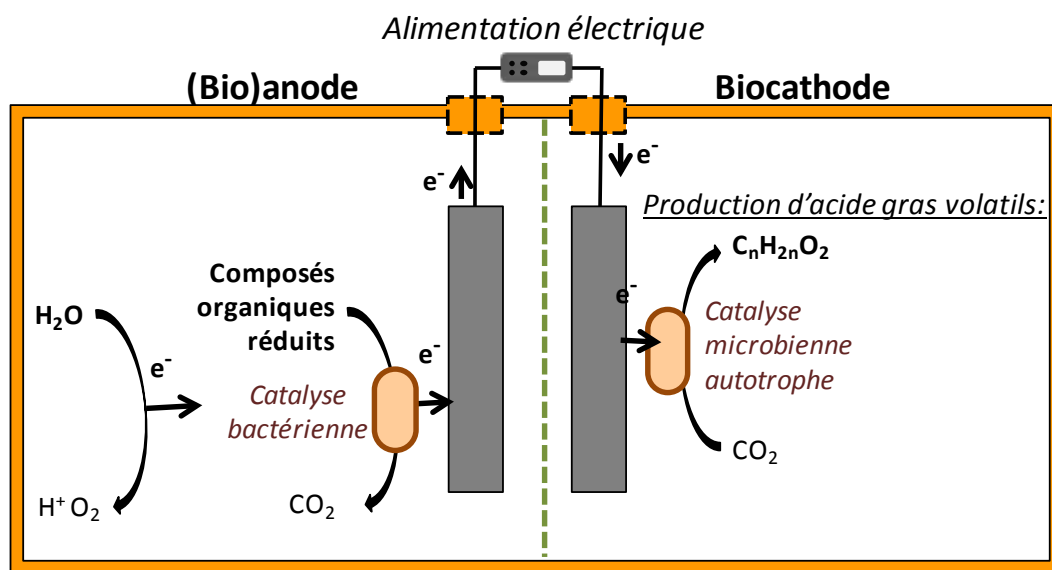


Figure 1 Schéma de fonctionnement d'un électrolyseur microbien particulier, comportant une biocathode microbienne synthétisant des acides gras volatils

Des travaux de recherche publiés par la suite se sont intéressés à l'identification d'espèces microbiennes capables de réaliser une telle électrosynthèse en association avec une cathode. Il a été démontré en cultures pures que d'autres espèces acétogènes pouvaient se développer sur ces cathodes et catalyser la réduction de CO_2 en acides organiques : *Sporomusa sphaeroides*, *Sporomusa silvacetica*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium aceticum*, *Moorella thermoacetica* (Nevin et al. 2011). D'après ces études, les biofilms formés à partir de cultures pures de microorganismes acétogènes permettent la production d'acétate en majorité, et d'oxo-butyrate ou de formate en quantité minoritaire, selon les espèces.

Pour les biofilms microbiens anodiques, certaines études ont montré que les biofilms développés à partir de cultures mixtes de microorganismes permettent d'obtenir des biofilms microbiens plus performants que les biofilms formés à partir de cultures pures. Des chercheurs ont donc tentés de développer des biofilms réduisant le CO_2 en acides organiques à partir d'un mélange de microorganismes provenant d'eaux usées d'une brasserie industrielle (Marshall et al. 2012). Pour ces dispositifs, les produits générés à la biocathode sont du méthane et de l'acétate. L'acétate est produit en concentration plus importante mais avec une efficacité de la conversion plus basse que celles rapportées pour des cultures pures. Les conditions opérationnelles du système microbioélectrochimique sont cependant différentes, ce qui rend les comparaisons de performances des biofilms difficiles.

Ces premières études mettent aussi en évidence que les performances de ces biocathodes à électrosynthèse sont faibles, malgré l'utilisation de cellules électrochimiques à design optimisée.

Les données de la littérature soulignent le besoin d'études plus approfondies sur l'interaction entre cathodes et biofilms microbiens catalysant des réactions de réduction. Nous avons cherché à moduler les propriétés physico-chimiques des cathodes afin de promouvoir l'adhésion de bactéries catalysant de façon efficace la réduction du dioxygène. Pour cela nous avons utilisé la réduction de sels d'aryle diazonium sur des plaques de graphite afin d'y greffer de façon covalente des fonctions chimiques d'intérêt. Ces résultats sont discutés en partie 2 dans le cas d'une biocathode à oxygène et en partie 3 dans le cas d'une biocathode à électrosynthèse.

2 Effet du greffage de sels d'aryle diazonium chargés positivement sur les performances d'un biofilm catalysant la réduction du dioxygène dans une pile à combustible microbiologique

Plusieurs études sur biofilms anodiques montrent que la présence de fonctions chargées positivement améliore l'adhésion bactérienne et les performances des bioanodes (cf. partie 1, Chapitre 3). Pour ce projet, nous avons greffé de façon covalente des fonctions triphényle phosphonium par réduction électrochimique de sels d'aryle diazonium sur des plaques de graphite, comme illustré par la **Figure 2** ci-dessous. Il s'agit d'une modification de surface que nous avons déjà étudiée dans des bioanodes à biofilms mixtes (Picot et al. 2011) et dans des bioanodes de cultures pures de *Geobacter sulfurreducens* (collaboration européenne avec le Biomolecular Electronics Research Laboratory de l'université de Galway en Irlande - projet PHC Ulysses, en cours).

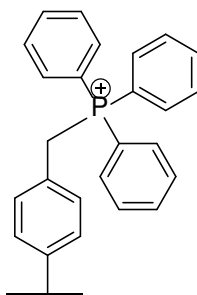


Figure 2 Structure du modifiant greffé sur la cathode utilisée dans cette étude : le benzyle triphényle phosphonium

La cathode modifiée a par la suite été connectée à une bioanode fonctionnelle dans une pile à combustible microbiologique. Le développement du biofilm cathodique a été réalisé en introduisant un mélange de bactéries provenant de la station d'épuration de Beaurade traitant les eaux résiduaires de la ville de Rennes. Le seul donneur d'électrons est la cathode et l'accepteur d'électrons est le dioxygène, activement fourni aux bactéries par bullage d'air dans le catholyte. Les performances de la cathode modifiée ont été comparées avec celles d'une cathode non modifiée et celles d'une cathode abiotique.

2.1 Procédure de modification et caractérisation des électrodes modifiées

2.1.1 Procédure de modification

La procédure utilisée ici est similaire à celle décrite dans le Chapitre 3. La modification se fait en milieu aqueux (HCl 0.1 M), sous bain de glace et après bullage d'argon dans la solution. Le sel de diazonium est généré à partir de l'aryle amine 4-aminobenzyle triphényle phosphonium (10 mM) après ajout de nitrite de sodium (20 mM). Après 60 secondes, on applique une série balayages de potentiel à l'électrode à greffer, sous la forme de cycles successifs. Les potentiels appliqués permettent la réduction du sel et le greffage covalent à la surface de l'électrode. La charge cathodique consommée par la réaction est intégrée à chaque cycle. La valeur de cette charge cathodique nous sert en effet à contrôler le degré de modification. Ce contrôle permet de s'assurer que la couche greffée ne bloque pas significativement le transfert des électrons vers l'électrode. En accord avec les résultats de nos précédents travaux (Picot et al. 2011), nous choisissons de ne pas dépasser 15 à 20 mC.cm⁻² et contrôlons l'effet de la modification sur le transfert électronique hétérogène à l'électrode (voir 2.1.2). Les voltamogrammes enregistrés au cours de la modification sont présentés dans la **Figure 3** ci-dessous.

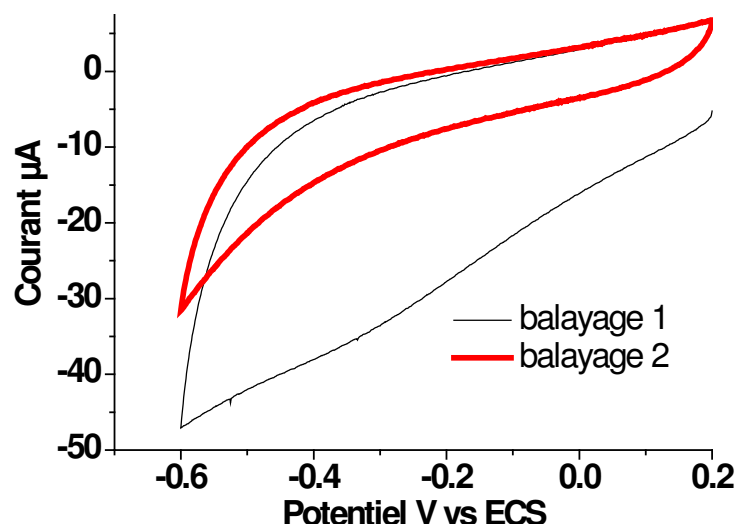


Figure 3 Voltammogrammes obtenus lors du greffage du sel de diazonium généré in situ à partir du 4 aminobenzyletriphenyle phosphonium (10 mM) par ajout de NaNO_2 (20 mM) dans HCl 0.1 M. 2 cycles ont été effectués à 0.1 V.s^{-1} . La charge consommée de 11 mC.cm^{-2} .

Au cours du greffage, on distingue sur le premier voltammogramme, un pic large de réduction vers -0.22 V vs ECS , correspondant à la réduction du sel de diazonium. Au cours du cycle suivant, le courant diminue fortement et on ne distingue plus le pic de réduction des sels de diazonium car le transfert électronique interfacial est ralenti par les molécules greffées de façon covalente sur la surface de l'électrode. Cette allure des voltammogrammes enregistrés au cours du greffage électrochimique est largement décrite dans la littérature (Pinson et Podvorica 2005, McCreery 2008, Bélanger et Pinson 2011) et constitue une première indication du bon déroulement du greffage. La charge enregistrée pendant le greffage électrochimique est de 11 mC.cm^{-2} et ne doit pas bloquer de façon excessive le transfert électronique hétérogène à l'électrode, ce qui est vérifié par l'utilisation de ferricyanure de potassium comme sonde électrochimique comme présenté dans le paragraphe ci-après.

2.1.2 Caractérisation du transfert électronique hétérogène entre la surface modifiée et le ferricyanure de potassium

Nous avons choisi de caractériser le transfert électronique hétérogène sur les électrodes étudiées en employant une sonde commune en électrochimie, le ferricyanure de potassium. Selon nos travaux précédents (Picot et al. 2011), le ferricyanure de potassium est une sonde adaptée à l'étude du transfert électronique hétérogène sur la surface d'électrode destinées à être colonisée par un biofilm bactérien électroactif. En effet, nous avons mis en évidence que la vitesse de ce transfert électronique évaluée par la différence de potentiel entre le pic

d'oxydation et de réduction de cette sonde électrochimique est corrélée aux performances de bioanodes microbiennes. Les voltamogrammes d'oxydoréduction du ferricyanure de potassium sur l'électrode avant et après modification sont présentés ci-après.

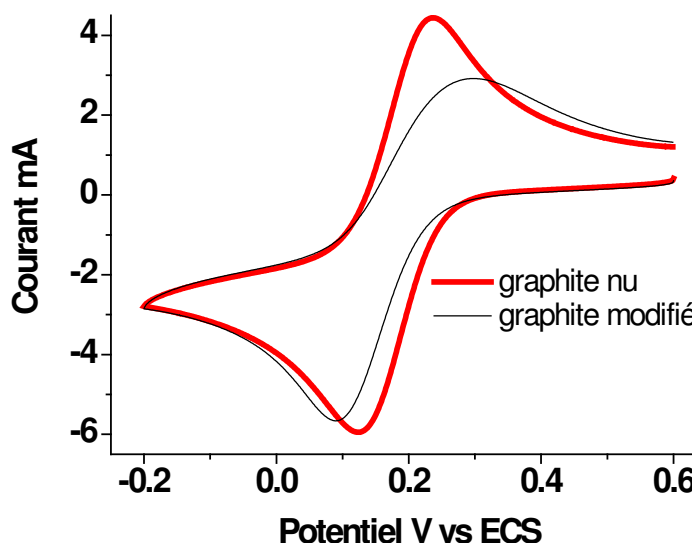


Figure 4 Voltamogramme de l'oxydoréduction du ferricyanure (2 mM dans 0.1 M KCl et 10 mM Tampon Phosphate pH7) sur électrode de graphite nue (noir) et sur électrode après greffage électrochimique de triphényle phosphonium (rouge). Vitesse de balayage 0.1 V.s^{-1} .

Sur graphite nu, on constate que l'écart entre le pic d'oxydation et le pic de réduction du ferricyanure est de 100 mV ce qui correspond à un transfert électronique hétérogène relativement rapide entre la surface non modifiée et le ferricyanure. Après modification, l'allure du voltamogramme d'oxydoréduction de la sonde sur la surface est légèrement modifiée. L'écart entre les pics est augmenté à 200 mV et les courants de pics sont plus faibles. Cette évolution de l'oxydo-réduction du ferricyanure à la surface de l'électrode traduit un ralentissement du transfert électronique hétérogène et atteste de la présence d'oligophénylènes greffés sur la surface de l'électrode. L'oxydoréduction du ferricyanure sur la surface est très peu ralentie et montre que la couche greffée ne bloque pas complètement le transfert électronique hétérogène, ce que l'on recherche.

Après le greffage covalent de groupements triphényle phosphonium sur la surface de l'électrode, cette électrode est étudiée en tant que cathode dans une pile à combustible microbiologique.

2.2 Etude de la phase de développement des biocathodes microbiennes

Il s'agit des premiers travaux menés au laboratoire sur des cathodes microbiennes. L'étude de la modification de surface sur la connexion et les performances d'un biofilm catalysant la réduction du dioxygène est réalisée sur un dispositif particulier de piles à combustible, schématisé dans la **Figure 5** ci-dessous

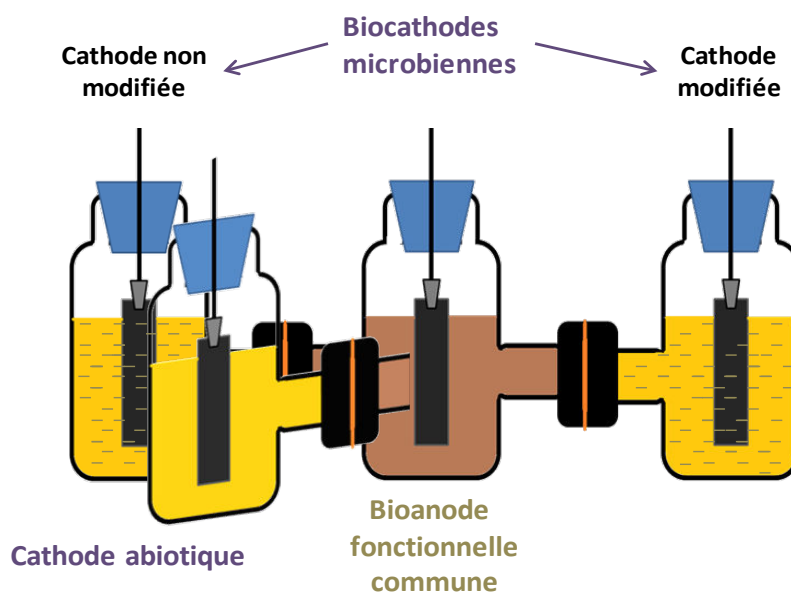


Figure 5 Schéma du dispositif utilisé pour l'étude de l'effet de la modification sur les performances de biocathodes microbiennes catalysant la réduction du dioxygène

Les trois cathodes étudiées sont connectées par des résistances externes de $1\text{k}\Omega$ à une bioanode microbienne commune. Cette bioanode a été développée au préalable sur une plaque de graphite non modifié (35 cm^2) dans une pile en H classique, similaire à celles décrites dans les Chapitres 2 et 3. Pour la bioanode, le donneur d'électrons est l'acétate et l'accepteur est l'anode. Les biocathodes (15 cm^2) sont inoculées à partir d'un mélange microbien provenant de boues activées et de boues dénitrifiantes de la station de Beaurades. Pour ces biocathodes, le seul donneur d'électrons est la cathode, l'accepteur est le dioxygène dissous. La cathode abiotique (12 cm^2) est maintenue dans un anolyte dépourvu de bactéries et est nettoyée régulièrement afin d'éviter tout développement microbien à sa surface.

Le courant délivré par les biopiles est mesuré quotidiennement et des études de voltamétrie cycliques sont réalisées afin de détecter le développement d'un biofilm catalysant la réduction du dioxygène.

Le développement de biofilms cathodiques réduisant le dioxygène est beaucoup plus difficile à obtenir qu'un biofilm anodique : La diversité des techniques décrites dans la littérature ainsi que les nombreuses discussions avec des chercheurs montrent que la meilleure stratégie pour former rapidement des biofilms cathodiques catalysant efficacement la réduction du dioxygène n'a pas encore été établie. Une revue récente (Erable et al. 2012) rassemble les durées nécessaires au développement de biocathodes microbiennes réduisant le dioxygène publiées. Si dans quelques cas, ces durées sont d'environ 15 jours et similaires à ce qu'on observe pour les biofilms anodiques microbiens, beaucoup de biocathodes nécessitent un développement sur plusieurs mois. La lenteur du développement des biocathodes est en accord avec l'hypothèse selon laquelle les microorganismes formant le biofilm sont de type chimiolithotrophes-autotrophes pour le carbone. Le terme de chimiolithotrophie désigne un métabolisme permettant la production d'énergie cellulaire à partir de l'oxydation d'un donneur d'électrons minéral (ici l'électrode). Le terme autotrophie pour le carbone désigne un métabolisme fonctionnant avec une source de carbone non organique (ici des bicarbonates), contrairement à l'hétérotrophie où la source de carbone est organique (acides gras volatils, glucides, lipides ou protéines). Les bactéries chimiolithotrophes-autotrophes pour le carbone ont une croissance très lente. Comme beaucoup d'études décrites dans la littérature, nous n'avons pas observé de développement effectif des biocathodes microbiennes durant les trois premiers mois qui ont suivi la mise en place de l'expérience, que ce soit sur le graphite nu ou sur le graphite modifié par les fonctions triphényle phosphonium. En effet, pendant ces trois premiers mois, les mesures de voltamétrie cyclique ne montrent pas d'amélioration significative de la réduction du dioxygène sur les biocathodes par rapport à la cathode abiotique. De même les puissances maximales des biocathodes en devenir ($0.85 \pm 0.1 \mu\text{W}.\text{cm}^{-2}$) sont sensiblement similaires à celles observées sur le contrôle abiotique ($0.9 \pm 0.1 \mu\text{W}.\text{cm}^{-2}$). Néanmoins, on observe les premiers signes du développement de biofilms cathodiques électroactifs sur les futures biocathodes. Ces indices du développement des biocathodes sont discutés dans les paragraphes suivants. Les biocathodes en devenir, en contact avec l'inoculum bactérien seront appelées cathodes biologiques, en opposition avec la cathode abiotique contrôle. Le terme de biocathodes sera utilisé pour les cathodes colonisées par un biofilm électroactif.

2.2.1 Courbes de polarisation

Durant les trois premiers mois suivant la mise en place de l'étude, on ne constate pas de différences significatives dans les puissances délivrées par les 3 piles. Cependant les courbes de

polarisation enregistrées (voir **Figure 6**) montrent des différences entre les potentiels cathodiques des biocathodes en devenir et la cathode abiotique.

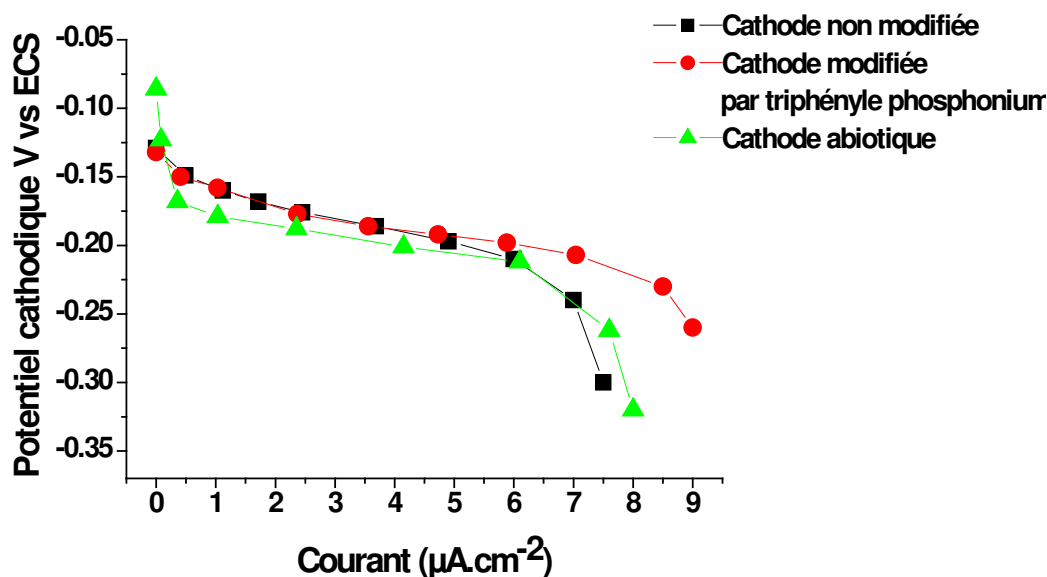


Figure 6 Courbes de polarisation des piles étudiées, le potentiel de la cathode est reporté en fonction du courant délivré par la pile

On remarque que l'allure des potentiels de la cathode abiotique est légèrement différente de celles des deux futures biocathodes pour les faibles courants. Pour ces faibles courants ($< 1 \mu\text{A.cm}^{-2}$), on observe en effet une chute de potentiel des cathodes biologiques moins importante, ce qui indique une surtension plus faible des réactions à l'électrode pour ces deux cathodes biologiques par rapport à la cathode abiotique. La baisse des surtensions suggèrent que des catalyseurs sont peut-être présents à la surface des cathodes biologiques, facilitant la réduction du dioxygène. Dans les premiers mois, ce catalyseur n'est peut-être pas présent en concentration suffisante, ce qui explique que les performances des deux cathodes biologiques sont encore très similaires à celles d'une cathode abiotique. Afin de détecter la présence d'une catalyse de la réduction du dioxygène sur les biocathodes, nous avons utilisé la voltamétrie cyclique.

2.2.2 Catalyse de la réduction du dioxygène

Les voltamogrammes enregistrés sur les deux cathodes biologiques sont similaires, nous choisissons donc de ne présenter que les voltamogrammes de la cathode en graphite non modifiée. Ces voltamogrammes enregistrés sur la cathode biologique non modifiée sont présentés ci-après, **Figure 7**.

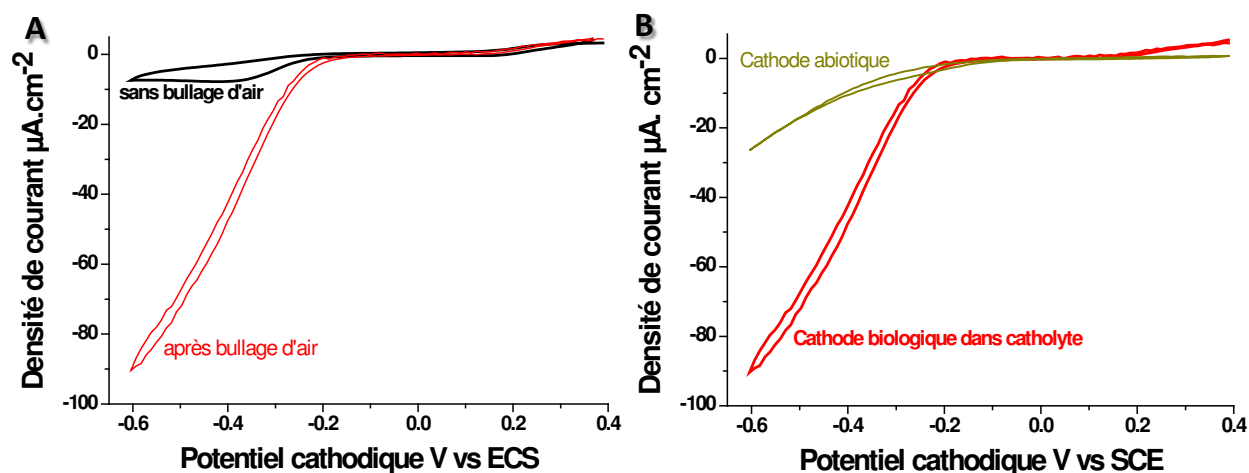


Figure 7 A. Voltamogrammes enregistré sur cathode biologique non modifiée après un bullage d'air ou sans bullage d'air dans le catholyte de départ de la pile (Tampon phosphate 20 mM pH 7.2, inoculum bactérien).

B. Voltamogrammes enregistré sur cathode biologique non modifiée et sur la cathode abiotique après bullage d'air. Le bullage d'air est réalisé avec une pompe à air durant 15 min avant le début de la voltamétrie cyclique. Pendant la mesure de voltamétrie, le système de bullage est retiré du catholyte mais est maintenu au dessus de la surface. Vitesse de balayage : $5mV \cdot s^{-1}$.

Sur la cathode biologique, on observe un courant faradique de réduction débutant à un potentiel d'environ -0.2 V vs ECS. L'intensité du courant est liée à la quantité de dioxygène car après bullage d'air dans le catholyte, on voit le courant de réduction augmenter d'un facteur 9 (**Figure 7A**). Le potentiel de seuil observé pour la réduction du dioxygène est plus bas que les potentiels généralement décrits lorsque la catalyse est effectuée par un biofilm microbien mature et efficace +0.3 V vs ECS (Ter Heijne et al. 2010) ou +0.34 V vs ECS (Thèse Matthieu Picot, Université Rennes 1). Le potentiel de seuil de la réduction du dioxygène dans notre cas est proche de celui décrit par les études de voltamétrie cyclique réalisées sur des souches pures de bactéries marines adsorbées de façon réversible à une électrode analytique de carbone vitreux catalysant la réduction du dioxygène (Parot et al. 2011). Sur la cathode abiotique, on observe aussi un courant de réduction du dioxygène mais dont l'intensité est faible même après bullage d'air dans le catholyte (**Figure 7B**).

Ces résultats suggèrent que les cathodes biologiques sont très peu ou pas colonisées par des bactéries électroactives et ne forment pas un véritable biofilm. Cette hypothèse a été vérifiée par observation au Microscope Electronique à Balayage d'échantillons des cathodes biologiques prélevées deux mois après la mise en place de l'expérience et présentées ci-dessous, **Figure 8**. On constate en effet une colonisation bactérienne peu dense. Les quelques bactéries observées en surface des cathodes semblent être des bactéries assez isolées et adsorbées de façon

réversible sur la cathode. Il ne s'agit pas d'un biofilm continu et épais comme on l'observe pour des bioanodes microbiennes.

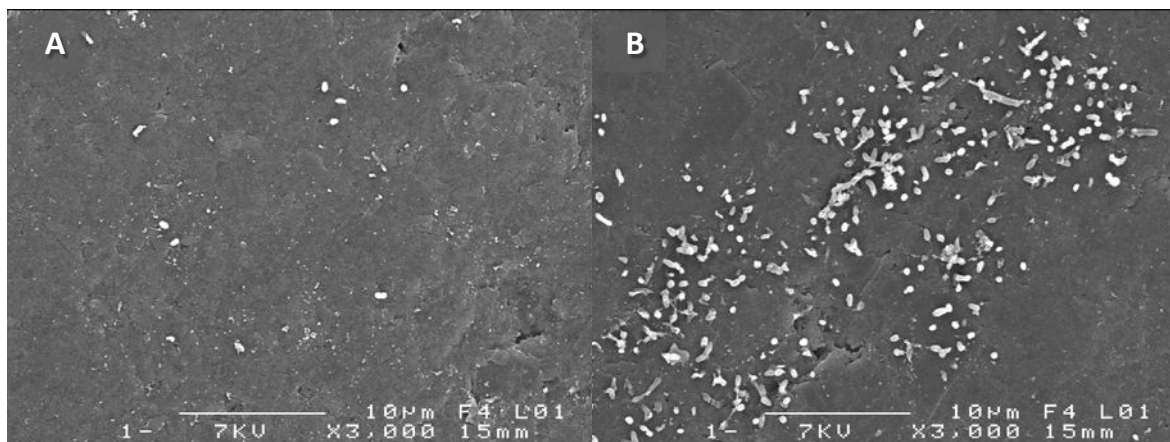


Figure 8 Images de Microscopie Electronique à balayage effectuées sur les cathodes biologiques : cathode non modifiée (A) et cathode modifiée avec des fonctions triphényle phosphonium (B). Grossissement x 3000.

Malgré l'absence d'un biofilm sur les cathodes biologiques, on observe une amélioration légère de la catalyse de la réduction du dioxygène sur les cathodes biologiques. Il est possible que cette amélioration fasse intervenir des molécules redox excrétées par les microorganismes en suspension dans le catholyte. Nous avons donc cherché à détecter d'éventuelles molécules redox dans le catholyte des cathodes biologiques, par voltamétrie cyclique en absence de l'accepteur final d'électrons des piles, le dioxygène.

2.2.3 Molécules électroactives détectées par voltamétrie cyclique

Les voltamogrammes enregistrés en absence de dioxygène sur les deux cathodes biologiques sont similaires, nous choisissons donc de ne présenter que les voltamogrammes de la cathode biologique développée sur graphite non modifié. Les voltamogrammes enregistrés sur la cathode biologique non modifiée après une demi-heure de bullage d'argon sont présentés en **Figure 9** ci-après.

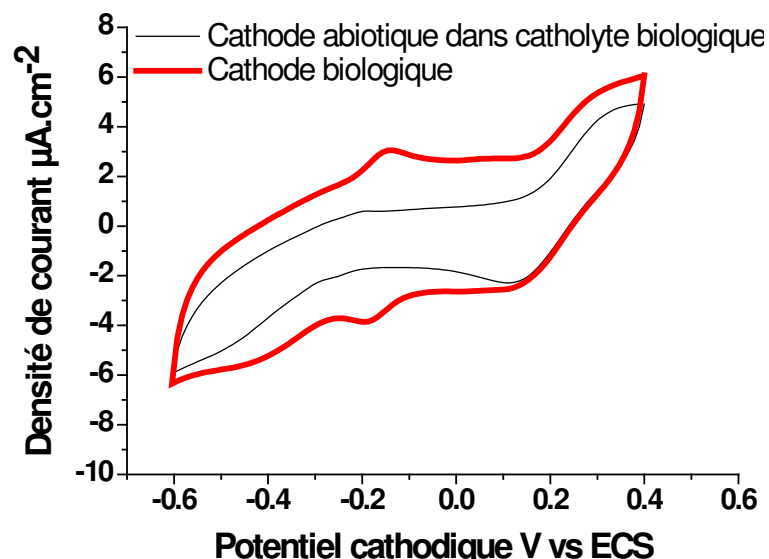


Figure 9 Voltamogrammes enregistré sur **cathode biologique non modifiée** et sur la cathode abiotique en condition anaérobie dans le même catholyte biologique (Tampon phosphate 20 mM pH 7.2, inoculum bactérien). Le bullage d'argon dure 30 min avant le début de la voltamétrie cyclique. Pendant la mesure de voltamétrie, l'arrivée d'argon est maintenue au dessus de la surface du catholyte. Vitesse de balayage : 5mV.s^{-1} .

On observe deux types de signaux réversibles sur la biocathode en conditions anaérobies :

- un signal proche de -0.2 V vs ECS que l'on n'observe pas sur une électrode nue plongée dans le catholyte mais qu'on observe sur la biocathode même lorsque le milieu est renouvelé. Il pourrait s'agir d'une espèce redox fortement adsorbée sur l'électrode. Cependant, les mesures du courant de pic faradique I_p de ce signal en fonction de la vitesse de balayage v montrent que I_p est linéaire avec $v^{0.5}$, ce qui est caractéristique d'un comportement diffusionnel et non d'une espèce adsorbée.

- un signal proche de $+0.2\text{ V vs ECS}$ que l'on retrouve sur électrode propre abiotique plongée dans le même catholyte biologique catholyte mais non détecté dans un électrolyte frais sans microorganismes ou dans la solution d'origine. Il s'agirait donc d'une molécule produite par les bactéries présentes dans le catholyte. Pour cette molécule, on observe aussi que I_p est linéaire avec $v^{0.5}$, ce qui est caractéristique d'un comportement diffusionnel et est en accord avec l'hypothèse d'une molécule excrétée par des bactéries en suspension dans le catholyte. Cette molécule est intéressante car son potentiel élevé en fait un relais électronique bactérien intéressant pour la catalyse de la réduction du dioxygène. Des molécules redox à haut potentiel ont également été observées par d'autres chercheurs. Par exemple, Xia et al. (2012) obtiennent des voltamogrammes très similaires aux nôtres.

2.2.4 Bilan

Durant les trois premiers mois qui suivent la mise en contact des cathodes connectées à un catholyte riches en bactéries, leurs performances dans des piles à combustible microbiologiques sont très similaires à celles de la cathode abiotique et on observe que peu de bactéries à la surface des deux cathodes biologiques. Néanmoins on est capable d'observer un début de catalyse de la réduction de dioxygène sur les cathodes biologiques, avec une baisse légère des surtensions des réactions de réduction (mesures de polarisation) et un courant de réduction du dioxygène plus élevé (voltamétrie cyclique). Dans ces cathodes biologiques, l'amélioration de la réduction du dioxygène est associée à la présence de molécules redox actives dissoutes dans le catholyte ou adsorbées sur les biocathodes.

Durant le quatrième mois qui suit la mise en place des cathodes biologiques, on assiste à un développement d'algues microscopiques vertes dans le catholyte mais aussi en surface des biocathodes. Suite à ce développement, on observe une amélioration significative des performances des cathodes biologiques par rapport à la cathode abiotique. On peut alors parler de véritables biocathodes. Les performances de ces biocathodes développées sont discutées ci-après.

2.3 Caractérisation des biocathodes développées

2.3.1 Courbes de polarisation

Après quatre mois de développement, on observe une augmentation des performances des piles à cathodes biologiques d'un facteur 3 à 4 par rapport à la cathode abiotique.

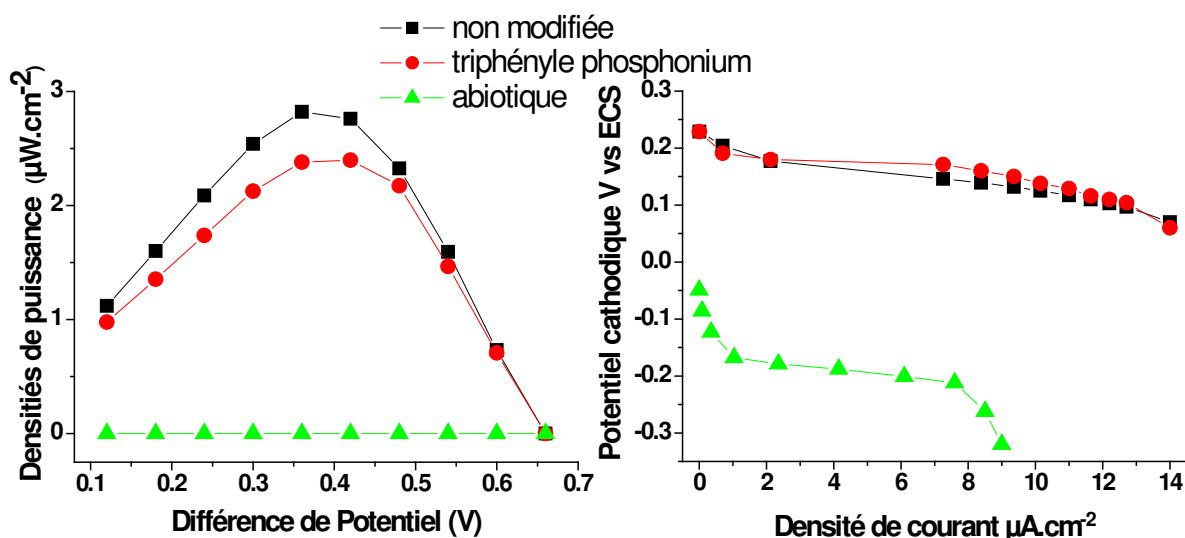


Figure 10 Mesures de polarisation sur les trois piles étudiées. Courbes de puissance (gauche) et courbes de polarisation correspondante avec la représentation du potentiel cathodique en fonction du courant délivré par la pile (droite)

Après développement des biofilms à la cathode, on peut réellement parler de pile microbienne puisqu'on a un biofilm catalysant l'oxydation de l'acétate à l'anode et un biofilm catalysant la réduction du dioxygène à la cathode. Les puissances délivrées par ces piles sont moins importantes que celles délivrées par les dispositifs habituellement utilisés au laboratoire. Pour ces dispositifs habituellement utilisés au laboratoire, l'objet d'étude est la bioanode et on utilise la réduction de ferricyanure introduit en concentration élevée afin que la partie cathodique ne soit pas limitante. Durant un mois de fonctionnement, la pile fonctionnant avec la biocathode non modifiée et celle fonctionnant avec une biocathode modifiée au triphényle phosphonium ont délivré une puissance de $3 \pm 1 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$. Ces puissances sont inférieures d'un ordre de grandeur par rapport à ce qu'on peut obtenir avec une cathode au ferricyanure.

Le potentiel cathodique à circuit ouvert est de +0.22 V contre -0.05 V vs ECS pour une cathode abiotique, ce qui est en accord avec ce qu'on peut trouver dans la littérature pour des biocathodes réalisées à partir d'une culture mixte venant d'eau usées (Erable et al. 2012). Les biocathodes abaissent les surtensions de la réduction du dioxygène à l'électrode car on se rapproche du potentiel thermodynamique de la réduction de dioxygène en eau à pH 7 ($E^0\text{O}_2/\text{H}_2\text{O} = 0.57 \text{ vs ECS}$). Ces mesures confirment la présence d'un biofilm sur les cathodes étudiées.

2.3.2 Catalyse efficace de la réduction du dioxygène mise en évidence par voltamétrie cyclique

Les voltamogrammes réalisés sur les biocathodes microbiennes développées montrent une allure du courant typique de ce qu'on observe lors de la catalyse de réaction à une électrode, avec une forme du courant sigmoïdale : une augmentation rapide du courant à partir +0.2 V vs ECS (potentiel de seuil) ; puis à partir d'environ 0.05 V vs ECS, l'intensité du courant de réduction devient indépendant du potentiel de la cathode et forme un plateau catalytique stationnaire (voir **Figure 11**). Le potentiel de demi-vague de ce courant catalyse est d'environ +0.14 V vs ECS

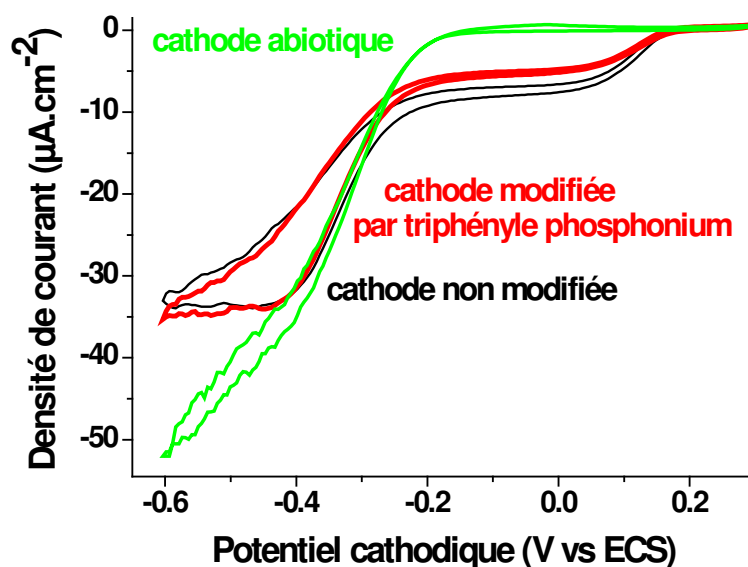


Figure 11 Voltamogrammes cycliques mesurées sur les trois cathodes de l'expérience dans leur catholyte respectif. vitesse de balayage : $5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$

De plus, lorsque la concentration en oxygène diminue dans le catholyte (bullage d'argon de plus en plus long), on observe une baisse du courant catalytique délivré (**Figure 12**), ci-après.

L'ensemble de ces observations montre bien la présence d'une catalyse de la réduction du dioxygène sur les cathodes biologiques à potentiel élevé, équivalent à ce qui est décrit dans la littérature (Ter Heijne et al. 2010, Thèse M. Picot, Université Rennes 1, 2013). Ces voltamogrammes montrent que les cathodes biologiques se sont bien développées en biocathodes. Il s'agit des premières biocathodes développées au laboratoire.

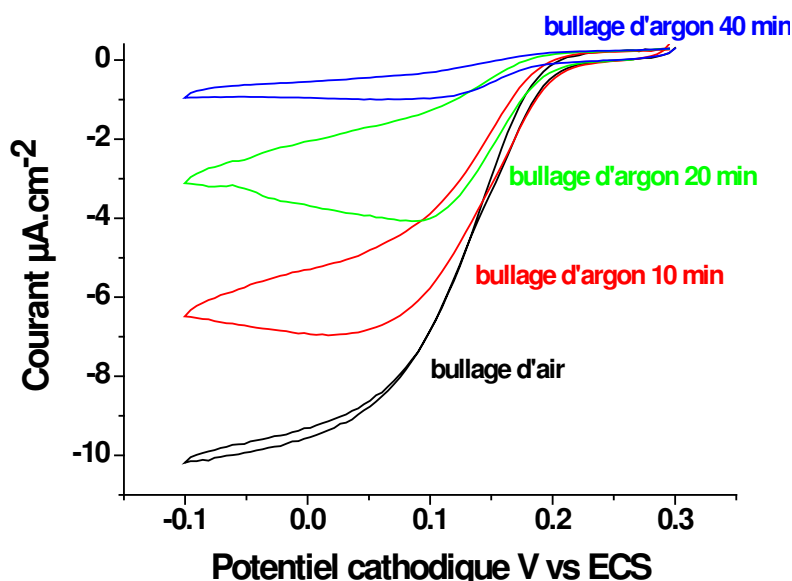


Figure 12 Voltamogrammes cycliques mesurées sur la cathode non modifiée dans leur catholyte respectif *in situ* (dans son catholyte). Pendant les mesures, l'arrivée d'argon est maintenue au dessus de la surface du catholyte. vitesse de balayage : 5 mV.s^{-1} .

En augmentant l'intervalle sur lequel on effectue la voltamétrie cyclique, on observe un second plateau à environ -0.25 V vs SCE sur les biocathodes et la cathode abiotique (**Figure 11**). Ce plateau correspondrait donc à la réduction abiotique du dioxygène sur carbone graphite nu. Le courant de cette réduction est plus important sur la cathode abiotique que sur les biocathodes car la présence d'un biofilm microbien à la surface des biocathodes diminue la surface de graphite nu sur lequel peut avoir lieu cette seconde réduction. Cette observation montre que la présence de microorganismes permet d'augmenter le potentiel de réduction du dioxygène sur graphite de $+0.45 \text{ V}$. Cela met aussi en évidence qu'une partie de la cathode n'est pas totalement recouverte par le biofilm. On peut alors penser que les densités de courant peuvent encore être augmentées si le biofilm se développe sur une plus grande surface.

Les voltamétries cycliques effectuées durant un mois de fonctionnement montrent que la cathode non modifiée a délivré un courant de $123 \pm 19 \text{ mA.m}^{-2}$ et la cathode modifiée par le triphényle phosphonium a délivré un courant de $117 \pm 20 \text{ mA.m}^{-2}$. Ces performances comparables suggèrent que la modification étudiée ici, n'a pas d'effet sur les performances des biocathodes. Cette modification permet cependant d'augmenter les performances d'un biofilm anodophile mixte. Nous avons attribué cette amélioration au fait que la fonction chargée positivement des groupements greffés permet d'attirer les bactéries anodophiles, très majoritairement Gram négative, et globalement chargés négativement. A la cathode de biofilms catalysant la réduction du dioxygène, la diversité des espèces microbiennes est plus importante

et il est possible que les membranes/parois des microorganismes présents aient une structure différente de celles des bactéries anodophiles. Ceci expliquerait que la modification testée n'ait pas d'effet sur la colonisation des cathodes par les bactéries catalysant la réduction du dioxygène.

La réduction microbienne du dioxygène se fait à un potentiel bien plus élevé que le potentiel de réduction observée durant la phase de développement des cathodes biologiques. Durant cette phase nous avons détecté deux molécules redox à environ -0.2 et à +0.2 V vs ECS. Après développement des biofilms, nous avons cherché à observer les signaux des molécules connectant le biofilm microbien sur les cathodes par voltamétrie cyclique en absence de dioxygène.

2.3.3 Molécules électroactives détectées par voltamétrie cyclique

Sur les biocathodes microbiennes développées, on ne distingue plus les pics centrés autour de -0.25 V vs ECS observés **Figure 9**, mais seulement des pics réversibles à des potentiels positifs, autour de +0.07 V et +0.18 V vs ECS. Ces pics sont détectés lorsque les biocathodes sont placées dans un catholyte frais, ce qui suggère qu'ils correspondent à des molécules redox confinées près de l'électrode. Les voltamogrammes de ces pics sont présentés dans la **Figure 13** ci-dessous.

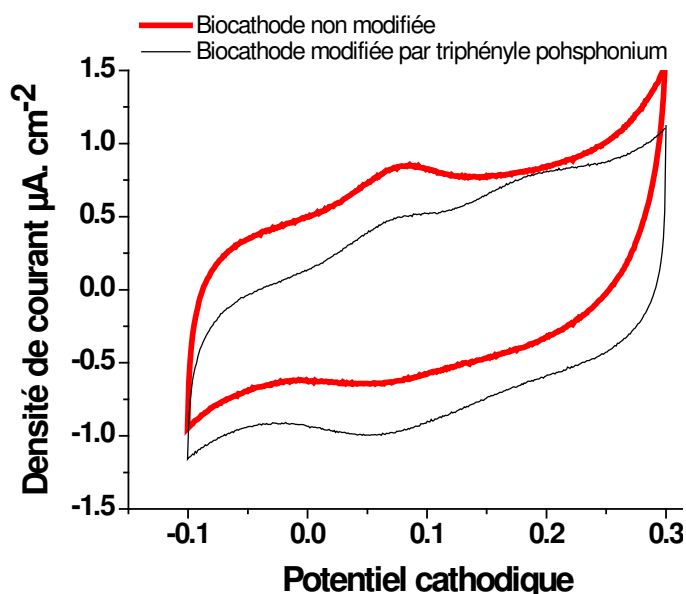


Figure 13 Voltamogrammes enregistré sur **cathode biologique non modifiée** et sur la cathode modifiée par des fonctions triphényle phosphonium greffés en condition anaérobie dans du tampon phosphate 20 mM à pH 7.2. Le bullage d'argon dure 30 min avant le début de la voltamétrie cyclique. Pendant la mesure de voltamétrie, l'arrivée d'argon est maintenue au dessus de la surface du catholyte. Vitesse de balayage : $5 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$

On constate une différence entre les voltamogrammes enregistrés sur la cathode de graphite non modifiée et la cathode modifiée par des fonctions triphényle phosphonium. Un signal réversible commun est détecté sur les deux biocathodes autour de +0.07 V vs ECS, proche du potentiel de demi-vague de la catalyse microbienne de la réduction du dioxygène (+0.14 V vs ECS). Pour le biofilm développé sur la cathode modifiée par des fonctions triphényle phosphonium, on détecte un pic d'oxydation supplémentaire à +0.18 V vs ECS. Ce pic d'oxydation diminue au cours de balayages voltamétriques successifs. Sur trois mesures de voltamétrie cyclique effectuées en un mois, nous l'avons détecté 2 fois sur 3. Il pourrait s'agir d'une molécule fragile et facilement dégradée. Des mesures des courants de pics en fonction de la vitesse de balayage utilisée pour la voltamétrie cyclique ont été réalisées. Cependant, les courants faradiques sont très faibles et le courant capacitif enregistré devient rapidement trop important, empêchant la mesure des courants faradiques lorsqu'on augmente la vitesse de balayage.

Les molécules électroactives détectées sur les biocathodes développées en absence de l'accepteur d'électrons (ici, le dioxygène) correspondent très probablement aux molécules redox connectant le biofilm microbien à la cathode. Si les voltamogrammes des molécules redox connectant les biofilms microbiens anodophiles sont assez communs dans la littérature, très peu de voltamogrammes de biofilms bactériens réduisant le dioxygène à des potentiels hauts sont publiés. Des voltamogrammes des molécules redox impliquées dans les réductions ont été détectées dans les piles étudiées par Strik et al. (2013) et sont reportées dans la thèse de M. Picot (Université de Rennes 1, 2012). Pour ces biocathodes, des pics réversibles sont détectés autour de +0.21 V vs ECS, ce qui est relativement proche des pics que nous détectons. Xia et al. (2012) détectent des molécules redox autour de +0.16 V vs ECS dans des cathodes biologiques et Chen et al. détectent des molécules redox à +0.105 V vs ECS (2008) et à +0.06 V vs EVS (2010). Mais pour ces trois dernières études, le lien entre les molécules redox détectées et la catalyse efficace de la réduction de dioxygène n'a pas été mis en évidence. Quatre molécules redox ont été détectées sur les biofilms d'*A. ferrooxidans* développés en milieu acide (Carbajosa et al. 2010). Parmi ces molécules, une molécule à +0.045 V vs ECS semble impliquée dans la réduction catalytique de dioxygène à pH 2. Découvrir la nature des molécules redox connectant les biofilms cathodiques aux électrodes et les espèces microbiennes impliquées serait une étape importante dans la compréhension du fonctionnement de tels biofilms. Seules des hypothèses ont été émises jusqu'ici. Certains cytochromes membranaires de type c ont des potentiels redox se rapprochant des potentiels des molécules que l'on détecte. On peut citer par exemple le

cytochrome Cyc2 isolé et caractérisé de cultures d'*A. ferrooxidans* dont le potentiel standard est de 0.324 V vs ECS et impliqué dans le transfert électronique depuis des minéraux de fer vers une bactérie (Yarzaba et al. 2002).

2.3.4 Biofilms microbien observés par Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

Des échantillons des trois cathodes ont été prélevés et observé par MEB afin d'avoir une idée plus précise de la morphologie des communautés présentes dans les biofilms cathodiques et de l'ampleur de la colonisation des cathodes. Les observations réalisées sur la cathode abiotique montre effectivement l'absence de microorganismes. Seules les images MEB des échantillons prélevées sur les biocathodes sont présentées ci-après (**Figure 14**).

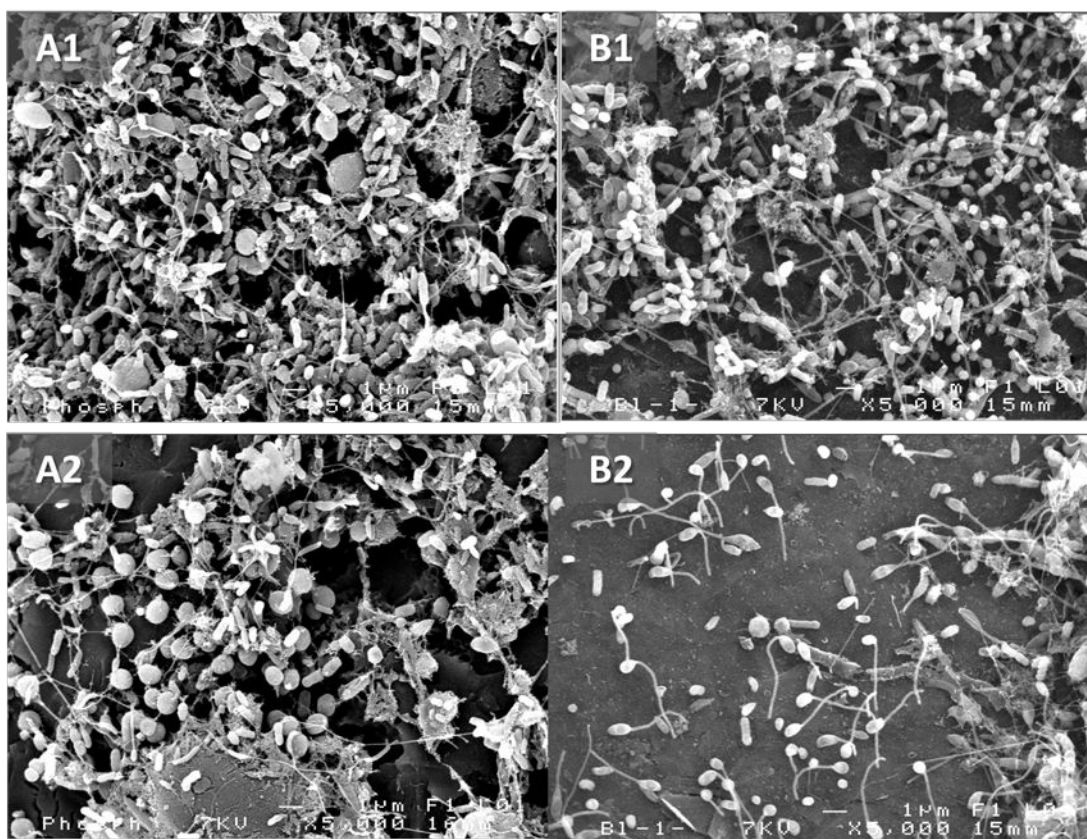


Figure 14 Images de Microscopie Electronique à balayage effectuées sur les cathodes biologiques : cathode non modifiée (A) et cathode modifiée avec des fonctions triphényle phosphonium (B). Les zones très colonisées sont numérotée 1 et les zones peu colonisées sont numérotée 2. Grossissement x 5000

Les images MEB confirment que le développement microbien sur l'électrode modifiée et l'électrode non modifiée est sensiblement le même. On constate aussi que le biofilm n'est pas continu car la surface de l'électrode est visible par endroit (**Figure 14 A2 et B2**) ce qui confirme l'hypothèse formulée lors des mesures de voltamétrie cyclique, pour lesquelles on observe en

plus de la réduction microbienne du dioxygène, une réduction semblable à celles observée sur graphite nu.

De plus, l'observation MEB apporte une compréhension supplémentaire du fonctionnement des biocathodes réduisant le dioxygène. En effet, nous avons observé à l'œil nu que le développement d'un biofilm catalysant efficacement la réduction du dioxygène a été concomitant avec le développement de microalgues dans le catholyte et sur les électrodes. Les observations au MEB permettent d'observer une association étroite entre des bactéries (microorganismes mesurant environ 1 μm) et les micro-algues (de plus gros diamètre, jusqu'à 10 μm).

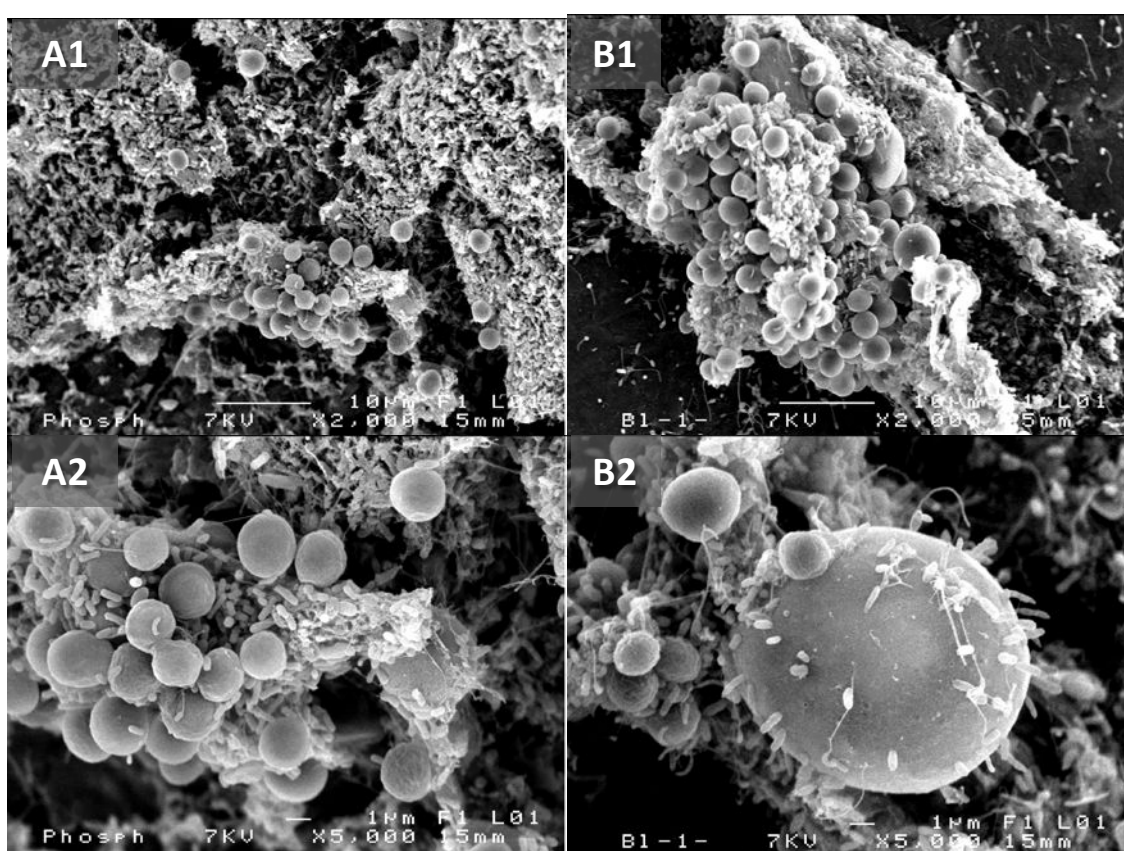


Figure 15 Images de Microscopie Electronique à balayage effectuées sur les cathodes biologiques : cathode non modifiée (A) et cathode modifiée avec des fonctions triphényle phosphonium (B). Les images prises à grossissement sont x 2000 sont numérotée 1 et les images prises à grossissement sont x 5000 sont numérotée 2.

Ces algues dans la biocathode peuvent jouer différents rôles. En effet, certaines algues telles que *Chlamydomonas reinhardtii* sont électroactives et ont démontré des capacités à catalyser la réduction du dioxygène (Liu et al. 2012). Le potentiel de seuil observé pour cette catalyse est cependant très bas (-0.416 V vs ECS) comparé au potentiel qu'on observe sur nos biocathodes.

Une autre hypothèse est que ces algues améliorent la diffusion de dioxygène dans le biofilm microbien. En effet, un problème récurrent des cathodes (biologiques ou abiotiques) est la solubilité faible du dioxygène dans l'eau qui entraîne des concentrations en O_2 faibles à proximité de la cathode. Ter Heijne et al. (2010) mettent en évidence que cette la diffusion de dioxygène dans les biofilms microbiens est une des limites principale des performances des biocathodes microbiennes. La présence d'un bullage ou de système de recirculation de l'anolyte n'influencent que très peu la concentration en dioxygène dans la couche de catholyte proche du biofilm et dans l'épaisseur du biofilm. En revanche, la photosynthèse des algues permettrait par un apport de dioxygène au plus proche du biofilm cathodique et en concentration élevée, de l'ordre de 20 mg/L (Strik et al. 2010) ce qui est presque 3 fois plus important que ce qui est mesuré pour des catholytes saturés en dioxygène (7 mg/L). Une telle association entre un biofilm bactérien et des algues dans les biocathodes à oxygène a été décrite pour la première fois par Strik et al. (2010). La colonisation par des algues a été fortuite dans notre cas mais des études de caractérisation de la présence d'algues à la cathode de piles microbiennes ont été publiées très récemment (Lobato et al. 2013, Gadjia et al. 2013, Gonzalez del Campo et al. 2013). Ces études montrent que lorsque la source lumineuse est adaptée, les algues sont capables d'augmenter les concentrations en dioxygène à la cathode et les performances de biofilms microbiens catalysant la réduction du dioxygène.

Peu d'études montrent des catalyses de réduction de dioxygène à potentiel aussi élevé. Mise à part notre propre étude, on peut citer deux études : celles de Ter Heijne et al. (2010) et de Matthieu Picot en partie discutée dans la publication de Strik et al. (2013) effectuées dans le même laboratoire de l'université de Wageningen. Dans l'étude de M. Picot /Strik et al. (2013), les biocathodes étaient aussi recouvertes d'algues microscopiques vertes. On peut alors se demander si l'association de bactéries et d'algues est nécessaire à une catalyse de la réduction du dioxygène à haut potentiel. Peu d'études de biocathodes à algues comportent des voltamogrammes de la réduction du dioxygène, ce qui ne permet pas de démontrer l'importance de l'association algues – bactéries dans la réduction à haut potentiel du dioxygène.

2.4 Bilan

Des biocathodes catalysant la réduction du dioxygène à haut potentiel ont été développées au laboratoire. Il s'agit de cathodes très performantes dans la catalyse de la réduction du dioxygène en termes d'abaissement des surtensions des réactions à la cathode si on compare

aux performances décrites dans la littérature. Ces biocathodes ont été développées sur une pile fonctionnant avec une bioanode microbienne, ce qui est en fait une pile totalement microbiologique.

Les caractérisations des cathodes biologiques lors de la phase de développement des biocathodes montrent qu'avant la colonisation de la cathode par le biofilm électroactif, les microorganismes en solution améliorent la réduction du dioxygène à potentiel assez bas par l'intermédiaire de molécules redox. Cette amélioration de la réduction du dioxygène est cependant très faible et n'augmentent pas les puissances délivrées par les piles à combustible microbiologiques. Une fois que la cathode est colonisée par un biofilm microbien, on obtient des puissances très supérieures à celles de cathodes abiotiques grâce à une catalyse à haut potentiel de la réduction du dioxygène. Les courants délivrés par la biocathodes sont cependant faibles, ce qui rend les performances d'une pile totalement microbiologique inférieures aux piles que l'on étudie généralement au laboratoire (anode microbiologique et cathode au ferricyanure de potassium). Nous avons noté que les biofilms catalysant la réduction du dioxygène à haut potentiel sont composés de bactéries et d'algues microscopiques en étroite association dans le biofilm.

Le greffage des fonctions triphényle phosphonium sur la surface de la cathode n'a pas démontré d'effets sur la durée de développement du biofilm ni sur les performances électriques par rapport à une cathode de graphite simple. Il s'agit d'un premier résultat sur l'influence des propriétés de surface des cathodes sur des biofilms cathodiques. Cette étude suggère que les constatations faites sur les bioanodes ne présagent pas du comportement des biocathodes. Ce constat est par ailleurs cohérent avec le fait que les espèces microbiennes à l'anode sont différentes des espèces microbiennes à la cathode.

La modification de surface de cathodes a aussi été testée sur le développement de biofilms de microorganismes homoacétogènes catalysant la réduction de CO_2 en acides gras volatils dans des électrolyseurs microbiens. Les résultats de cette première étude sont discutés dans la partie 3 suivante.

3 Effet du greffage de sels d'aryle diazonium sur les performances de biofilms cathodiques homoacétogènes dans des électrolyseurs microbiens

Cette étude a été réalisée en collaboration avec le laboratoire LabMet de l'Université de Gand (Belgique) dans le cadre d'un Projet Hubert Curien (Ministère des affaires étrangères), le PHC Tournesol. Le but de cette étude est d'améliorer et de comprendre l'influence des propriétés de surface des cathodes sur les performances d'un type de biofilm microbien particulier dont la découverte est récente (Nevin et al. 2010). Ces biofilms bactériens cathodiques intégrés à des électrolyseurs sont particulièrement intéressants car ils sont capables de produire des molécules organiques à haute valeur ajoutée dans des électrolyseurs (Logan et Rabaey, 2012). Les électrolyseurs microbiens sont des dispositifs possédant un potentiel économique qui est réellement supérieur à celui des piles à combustible microbiologiques. Les performances des biofilms cathodiques sont cependant encore faibles pour que la technologie soit industrialisable. A l'instar des autres biofilms bactériens électroactifs étudiés, une limite principale des performances est la connexion des bactéries à l'électrode.

Afin d'améliorer l'interface entre les cathodes et les bactéries impliquées dans l'électrosynthèse, nous avons choisi de modifier les propriétés de surface de ces cathodes par greffage électrochimique de fonctions chimiques qui ont déjà montré leur intérêt à l'anode de piles à combustible microbiologiques. Nous avons choisi de tester deux types de fonctionnalisation :

- Une fonction chargée positivement : le triméthyle ammonium
- Une fonction se liant avec les diols de la membrane des bactéries : l'acide boronique

Ces deux fonctions chimiques ont déjà prouvé leur intérêt à l'anode des systèmes microbioélectrochimiques classiques que sont les piles à combustible microbiologiques (Guo et al. 2013, Lapinsonnière et al. 2013). Dans le cas du triméthyle ammonium, un mécanisme probable serait que la surface fonctionnalisée attirerait la membrane bactérienne externe par interaction électrostatique, de manière tout à fait équivalente à la fonction triphényle phosphonium que nous avons testé à l'anode de piles à combustible microbiologiques (Picot et al. 2011). Le greffage de cette fonction permet également d'augmenter le rapport N/C de la surface d'électrode à coloniser. Plusieurs études sur les modifications anodiques montrent que

l'amélioration des performances des bioanodes est liée à cette augmentation du rapport N/C (cf Chapitre 3). Le cas de l'influence de la modification par des acides boroniques sur les performances de bioanodes microbiennes a fait l'objet du Chapitre 3 et d'un article (Lapinsonnière et al. 2013). Ces acides sont capables de former des esters cycliques avec des diols en positions -1,2 et -1,3, notamment présents dans les polysaccharides. Dans notre étude sur les bioanodes nous avons montré que le temps de formation des biofilms électroactifs et les performances des bioanodes étaient améliorés sur des électrodes modifiées par des fonctions acides boroniques. Une explication probable est que ces acides boroniques greffés permettraient d'améliorer la connexion des bactéries grâce aux liaisons établies entre la surface greffée et les lipopolysaccharides de la membrane externe des bactéries.

La méthode utilisée pour ces deux modifications est la réduction électrochimique de sels d'aryle diazonium sur un matériau d'électrode poreux, le feutre de carbone

3.1 Etude de la procédure de modification sur feutre de graphite

3.1.1 Caractérisation des électrodes non modifiées

Le matériau d'électrode utilisé est le feutre de graphite. Modifier ce type de matériau par réduction électrochimique de sels de diazonium est un peu plus compliqué que sur un matériau non poreux comme la plaque de graphite, utilisée dans les études décrites précédemment, notamment en ce qui concerne le contrôle du degré de modification par la densité de charge. Comme nous l'avons déjà discuté précédemment, dans le cas d'une utilisation des électrodes fonctionnalisées dans des systèmes microbioélectrochimiques, la quantité de molécules greffées doit être contrôlée avec soin. Afin de contrôler le degré de modification, la densité de charge consommée durant le greffage est utilisée. Or, pour contrôler la densité de charge consommée durant le greffage, il est indispensable de connaître la surface de l'électrode. Nous avons décidé de mesurer la surface spécifique du feutre de carbone en utilisant une sonde électrochimique : le ferricyanure de potassium. Les voltamogrammes sont présentés en **Figure 16**, ci-après.

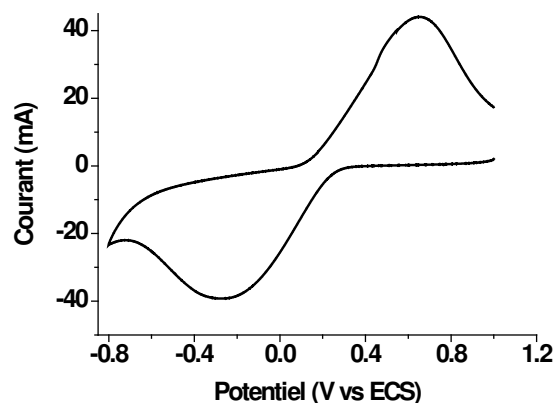


Figure 16 Voltamogrammes de l'oxydoréduction du ferricyanure sur feutre de graphite (50mm×20mm×3mm). L'électrolyte est composé de ferricyanure de potassium à 2mM dissous dans une solution de KCl à 0.1M et de tampon phosphate pH 7 10mM. Vitesse de balayage : 0.1 V.s⁻¹.

L'intensité des pics de la sonde permet d'estimer la surface électrochimique de l'électrode analysée grâce à l'équation de Randles-Sevcik, appliquée à une solution à température ambiante :

$$I_p = (269000)n^{3/2}AD^{1/2}Cv^{1/2}$$

- I_p = courant de pic en ampère
- n = nombre d'électrons impliqués dans la réaction d'oxydoréduction, ici 1
- A = surface de l'électrode en cm²
- D = coefficient de diffusion en cm²/s (ici 0,76. 10⁻⁵ cm².s⁻¹)
- C = concentration en mol/cm³
- v = vitesse de balayage en V/s

Pour les feutre de graphite utilisés, on mesure une intensité de pic de 30.4 mA. La surface électrochimique calculée est donc de 64.8 cm² ; cette valeur est par la suite utilisée pour les calculs de densité de charge.

On observe également que l'écart entre les pics d'oxydoréduction est plutôt large (environ 900 mV) comparé par exemple à une électrode carbone vitreux de 0.07cm² (80mV). Cela peut s'expliquer à la fois par la différence de taille des deux matériaux et par la différence de transfert électronique hétérogène avec le ferricyanure

3.1.2 Fonctionnalisation avec un groupement positif

Les électrodes ont été ensuite modifiées par voltamétrie cyclique après génération *in situ* du sel de diazonium à partir de l'aryle amine correspondante : la 4-aminophényle triméthyle ammonium, comme résumé sur le schéma suivant.

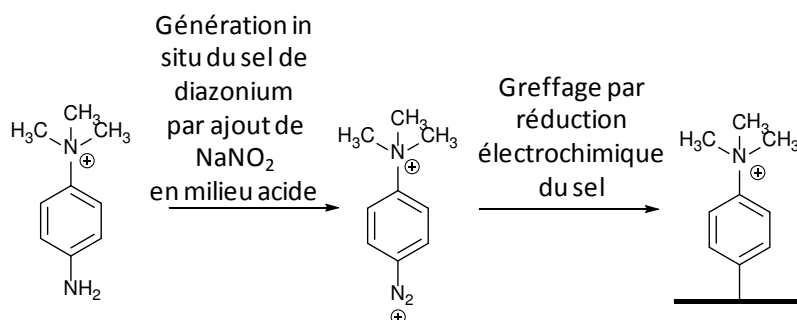


Figure 17 Schéma de fonctionnalisation du feutre par le groupement triméthyle ammonium, chargé positivement

La modification se fait en milieu aqueux (HCl 0.1 M), sous bain de glace et après bullage d'argon dans la solution. Le sel de diazonium est généré à partir de la 4-aminophényle triméthyle ammonium (2 mM) après ajout de nitrite de sodium (4 mM). Après 60 secondes, on applique une série balayages de potentiel à l'électrode à greffer, sous la forme de cycles successifs. Les potentiels appliqués permettent la réduction du sel et le greffage covalent à la surface de l'électrode. La charge cathodique consommée par la réaction est intégrée à chaque cycle. En accord avec les résultats de nos précédents travaux (Picot et al. 2011), nous choisissons de ne pas dépasser 15 à 20 mC.cm^{-2} . Les expériences ont été réalisées en duplicat : les densités de charge enregistrées pour chaque électrode modifiée avec ce groupement sont de 17.9 et 18.8 mC.cm^{-2} . Un voltamogramme typique enregistré au cours de la modification est présenté ci-dessous **Figure 18**.

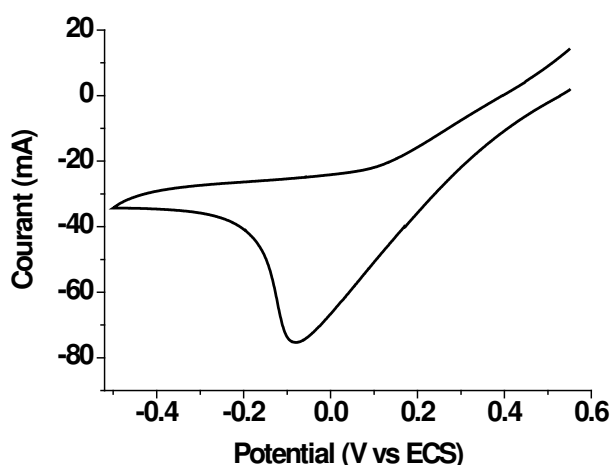


Figure 18 Voltamogramme (1^e balayage) obtenu lors du greffage du sel de diazonium généré in situ à partir du 4 aminophényle triphényle phosphonium (2 mM) par ajout de NaNO_2 (4 mM) dans HCl 0.1 M. 2 cycles ont été effectués à 0.05 V.s^{-1} .

Le voltamogramme montre un pic de réduction bien défini à environ -0.05 V vs SCE, correspondant à la réduction et au greffage du sel de diazonium sur la surface de l'électrode.

Le transfert électronique entre la surface fonctionnalisée et une sonde électrochimique a ensuite été étudiée par voltamétrie cyclique et comparée à celui enregistré sur un feutre non modifié (voir **Figure 19** ci-dessous)

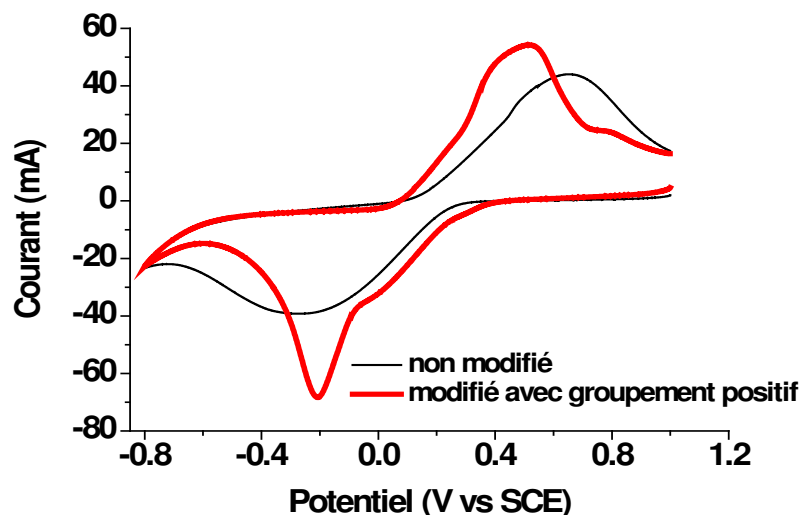


Figure 19 Voltammogrammes de l'oxydoréduction du ferricyanure avant (noir) et après greffage (rouge). L'électrolyte est composé de ferricyanure de potassium à 2mM dissous dans une solution de KCl à 0.1M et de tampon phosphate pH 7 10 mM. Vitesse de balayage : 0.1 V.s^{-1} .

Il est assez surprenant d'observer qu'après modification, l'intensité des pics augmente légèrement et que l'écart entre les pics baisse. Nous avons en effet jusqu'ici observé que la présence d'oligophénylènes greffés sur l'électrode entraînait un ralentissement de l'oxydoréduction du ferricyanure à la surface de l'électrode, et donc un écartement et une baisse d'intensité des pics. Une explication très probable est que la fonctionnalisation entraîne une adsorption plus facile du ferricyanure chargé négativement sur l'électrode. Cette hypothèse est par ailleurs confirmée par l'allure du pic de réduction du ferricyanure sur l'électrode modifiée. On observe en effet que le pic s'affine et est bien défini ce qui est typique des phénomènes de sorption/désorption de molécules électroactives sur l'électrode.

3.1.3 Fonctionnalisation avec des acides boroniques

Les feutres de graphites ont été fonctionnalisés selon la même technique que celle utilisée précédemment. Dans les premiers temps de la fonctionnalisation, les acides boroniques sont protégés par un ester pinacol. Après greffage, la déprotection par le périodate de sodium permet d'obtenir des acides boroniques en surface de l'électrode, comme résumé par le schéma suivant (**Figure 20**).

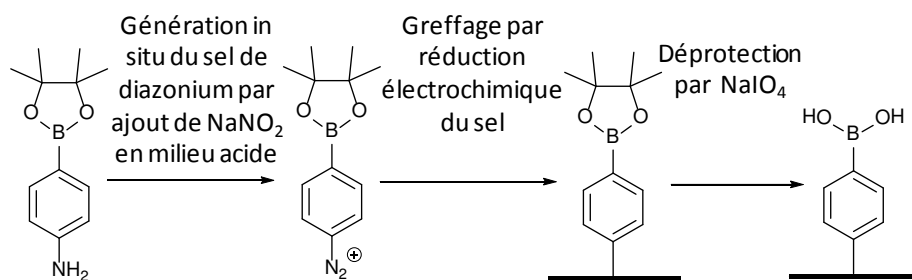


Figure 20 Schéma de fonctionnalisation du feutre par des acides boroniques

Dans le cas de cette modification, entre 4 et 10 balayages ont été nécessaires afin d'obtenir un degré de modification suffisant, soit des densités de charge consommées de 16,4 et 16,6 mC.cm^{-2} pour les électrodes du duplicat utilisées dans les électrolyseurs microbiens étudiés par la suite. Des voltamogrammes typiques enregistrés au cours de la modification sont présentés en **Figure 21** ci-après.

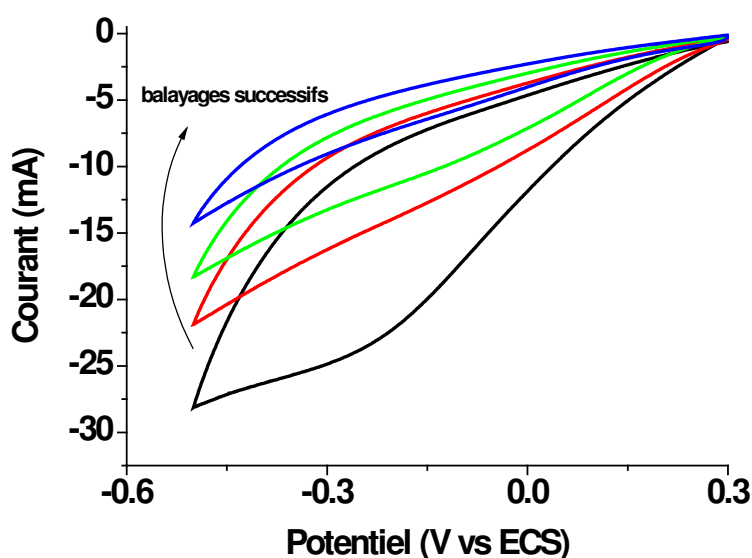


Figure 21 Voltamogrammes obtenus lors du greffage du sel de diazonium généré in situ à partir du 4 aminophényle acide boronique pinacol ester (2 mM) par ajout de NaNO_2 (4 mM) dans HCl 0.1 M. 2 cycles ont été effectués à 0.05 V.s^{-1}

Le premier voltamogramme montre un pic de réduction à environ -0.2 V vs ECS correspondant à la réduction et au greffage du sel de diazonium sur l'électrode. Les cycles successifs montrent une décroissance du courant due au blocage progressif de l'électrode par la couche de polyphénylène greffée.

L'étape finale de fonctionnalisation est la déprotection. Celle-ci a été réalisée en trempant les électrodes modifiées dans une solution de périodate de sodium (5x50 mM de NaIO_4 dans une solution de THF/eau 1:5) durant une nuit.

Le transfert électronique entre la surface d'électrode et une sonde électrochimique a été étudiée par voltamétrie cyclique pour les diverses étapes de la fonctionnalisation de surface (voir **Figure 22**, ci-après)

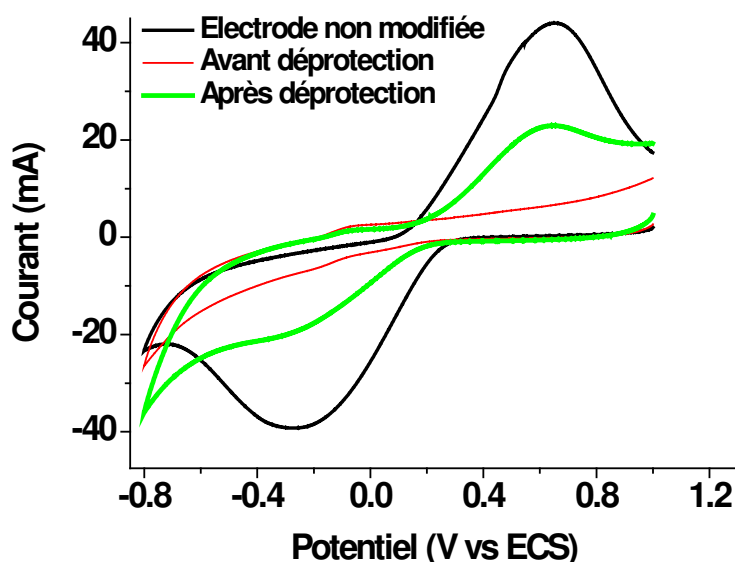


Figure 22 Voltammogrammes de l'oxydoréduction du ferricyanure avant greffage (noir) et avant (rouge) et après déprotection des acides boroniques (vert). L'électrolyte est composé de ferricyanure de potassium à 2 mM dissous dans une solution de KCl à 0.1M et de tampon phosphate pH 7 10mM. Vitesse de balayage : 0.1 V.s^{-1} .

De façon attendue d'après nos travaux précédents (Chapitre 3), juste après la première étape de greffage, la surface portant les acides boroniques protégés bloque le transfert électronique. En effet l'écart entre les pics est tel que les pics ne sont plus observés dans les conditions de l'expérience. Cependant après déprotection, on est à nouveau capable d'observer l'oxydoréduction du ferricyanure sur le feutre, bien que les pics soient moins intenses qu'avant la fonctionnalisation.

Les électrodes fonctionnalisées sont ensuite utilisées comme cathodes de piles à électrosynthèse microbienne.

3.2 Premiers résultats d'électrosynthèse microbienne sur les feutres fonctionnalisés

3.2.1 Dispositifs utilisés et mesures effectuées

Les dispositifs utilisés pour l'électrosynthèse microbienne ont été conçus et étudiés au LabMet (Laboratory of Microbial Ecology and Technology) de Gand avec lequel nous avons collaboré dans le cadre du projet européen PHC Tournesol 2012. La fonctionnalisation des

feutres a été réalisée à Rennes dans notre laboratoire avec deux étudiants de Gand. Je suis ensuite allée étudier les piles à électrosynthèse microbienne lors d'un séjour au LabMet. Les dispositifs étudiés ne sont pas les piles en H décrites jusqu'ici mais des dispositifs au design optimisé. L'anode est une anode abiotique où la réaction d'oxydation est celle de l'eau en dioxygène et fonctionne en système continu. La cathode fonctionne avec un flux de recirculation. L'inoculum utilisé est un mélange de plusieurs espèces microbiennes homoacétogènes et anaérobies strictes: *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium butylicum*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium acetobutylicum* et *Acetobacterium woodii*. Afin de former le biofilm cathodique, un courant de 750 μA est appliqué entre l'anode et la cathode. A la cathode, le seul donneur d'électrons est la cathode, et la source de carbone fournie est du bicarbonate, une source de carbone inorganique.

Afin de contrôler les performances des réacteurs, la production d'acides gras volatils a été mesurée par chromatographie gazeuse, en particulier le formate (1 carbone), l'acétate (2 carbones), le propionate (3 carbones) et le butyrate (4 carbones), dont les structures sont présentées en **Figure 23** ci-dessous. La consommation de CO_2 a également été mesurée par chromatographie gazeuse.

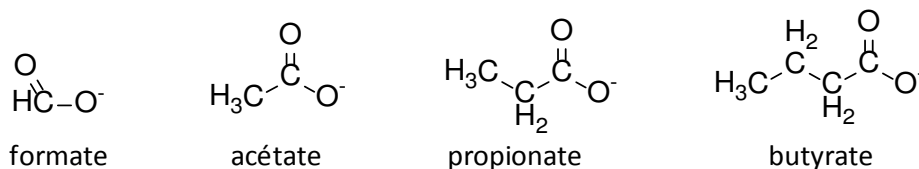


Figure 23 Acides gras volatils mesurés dans les réacteurs de microbioélectrosynthèse

Au total six réacteurs sont mis en place :

- 2 contrôles dont les cathodes son des feutres de graphite non modifiés
- 2 réacteurs dont les cathodes ont été modifiés par des groupements chargés positivement
- 2 réacteurs dont les cathodes ont été modifiées par des acides boroniques

Les phénomènes généraux mis en évidence sont similaires dans les trois types d'électrolyseur étudiés. Pour plus de clarté, nous discuterons dans un premier temps des résultats des électrosynthétiseurs utilisant une cathode en feutre de graphite non modifié. Puis nous discuterons des différences observées selon les modifications de cathodes testées.

3.2.2 Performances des électrolyseurs à cathodes non modifiées

Dans les bioréacteurs, les microorganismes homoacétogènes ont pour seul donneur d'électrons, l'électrode et pour seule source de carbone le CO_2 . Ces microorganismes sont capables de réduire le CO_2 en acides gras volatils en utilisant les électrons fournis par l'électrode. Nous avons suivi la formation de quatre acides organiques, le formate, l'acétate, le propionate, et le butyrate, comme présenté dans la **Figure 24** ci-dessous :

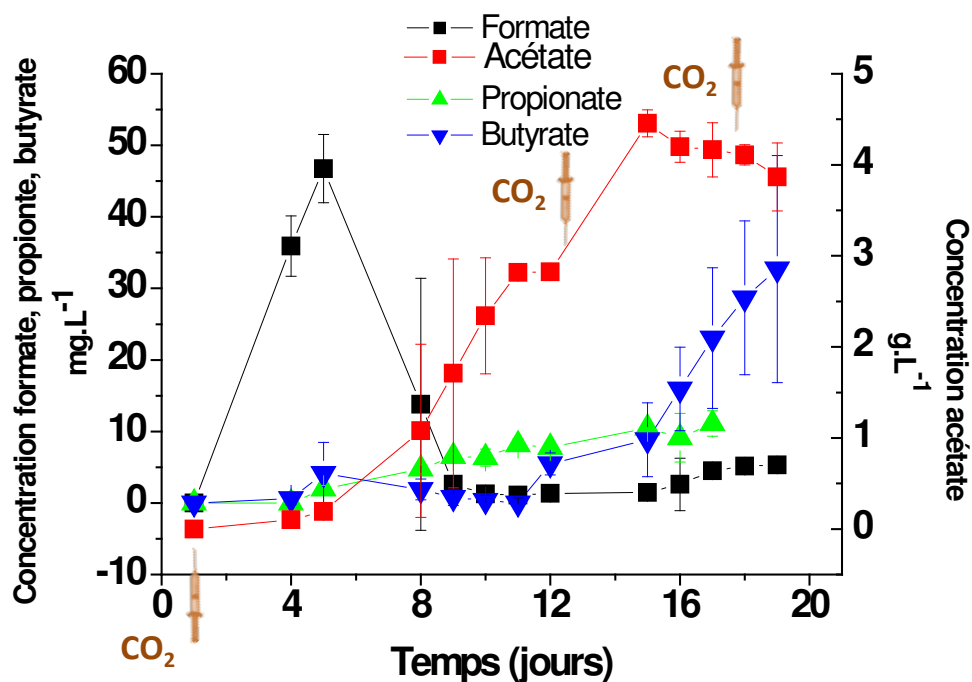


Figure 24 Production d'acides gras volatils dans les électrolyseurs microbiens à cathode non modifiée. Les courbes sont réalisées à partir des moyennes des deux électrolyseurs du duplicat.

Dès les premiers jours de l'expérience, on observe la production de formate à la cathode. La concentration de ce premier produit atteint un pic de production au bout du 5^e jour, avant que sa concentration ne diminue jusqu'à devenir très faible au jour 8.

Cette diminution de la concentration en formate est concomitante avec l'apparition d'acétate et de propionate. Cette augmentation indiquerait que le formate (acide organique à 1 carbone) est un produit intermédiaire dans la synthèse de l'acétate, acide gras volatil à 2 carbones et le propionate, acide gras volatil à 3 carbones. Leur production augmente de façon rapide jusqu'à plafonner à un plateau du jour 10 au jour 12. L'acétate est l'acide organique majoritairement produit lors de l'électrosynthèse car sa concentration est de deux ordres de grandeur plus importante que celle du propionate ou du butyrate.

Après le jour 12, on observe une seconde augmentation de la production d'acétate et de propionate due à l'ajout de CO_2 dans les réacteurs. Cette seconde augmentation de la production d'acétate atteint à nouveau un pseudo-plateau persistant jusqu'à la fin de l'expérience malgré un autre ajout de CO_2 (jour 18, **Figure 24**), indiquant que les concentrations maximales en acétate ont été atteintes dans les réacteurs.

Par ailleurs, l'ajout de CO_2 au jour 12 semble permettre la production d'un autre acide gras à chaîne plus longue, le butyrate. En effet après cet ajout de CO_2 , on observe une augmentation rapide de la concentration en butyrate tendant vers un plateau en fin d'expérience. La production de butyrate s'accompagne d'une légère baisse de la concentration en acétate dans les réacteurs. Ceci suggère que la production de butyrate se ferait par élongation de la chaîne carbonée à partir d'acétate. La plupart des études décrites jusqu'ici sont réalisées sur des cultures pures de microorganismes acétogènes. Une seule étude publiée étudie la réduction de CO_2 en acides organiques à partir d'une culture microbienne mixte (Marshall et al. 2012). Aucune étude publiée, ne décrit la production séquentielle d'acides organiques avec une chaîne aliphatique de plus en plus longue.

3.2.3 Comparaison des performances des électrolyseurs à cathodes modifiées

La discussion précédente sur les électrolyseurs contrôles (comportant des cathodes en feutre de graphite non modifiées) décrit en réalité le comportement général de l'ensemble des réacteurs étudiés (à cathode modifiée ou non). On constate cependant que selon les cathodes testées, les acides gras sont produits en quantité différente et à des moments différents (voir **Figure 25**). Il s'agit de premiers résultats montrant l'effet de modifications de surface sur la production d'acides organiques par des électrosynthétiseurs microbiens et seront discutés ci-après. Ces premières expériences doivent cependant être répétées car nous constatons une grande disparité des résultats au sein des duplicats (voir écart type représentés par les barres d'erreur **Figure 25**). Ceci rend difficile les conclusions quant à un effet possible des modifications.

Pour la modification comportant des fonctions chargées positivement, on observe un profil de production des acides gras dans le temps similaire à ce qui est observé pour les cathodes non modifiées. Les concentrations sont en moyenne légèrement inférieures à celles des cathodes contrôles non modifiées, en particulier en ce qui concerne la production du butyrate, acide gras à la plus longue chaîne. Des travaux publiés pendant notre propre étude (Zhang et al. 2013) décrivent pour la première fois l'effet de modification de surface de cathode sur des biofilms

composés de *Sporomusa ovata* (culture pure). Sur ces biofilms, on constate que parmi les modifications permettant l'introduction de fonctions chargées positivement, certaines ont un effet bénéfique sur la production d'acétate par le biofilm cathodique. D'autres n'ont pas d'effets, c'est le cas de la modification par traitement thermique à l'ammoniac. Ce traitement a été testé à l'anode de piles à combustible microbiologiques et a permis d'augmenter les performances de bioanodes (Wang et al. 2009). L'augmentation des performances est attribuée à la formation de groupements amines protonées qui permettraient une adsorption favorisée des bactéries sur l'électrode. Dans notre cas, le groupement chargé positivement est portée par un ammonium quaternaire et on ne constate pas non plus d'amélioration des performances des biocathodes. Ces résultats mettent en évidence une fois de plus que les modifications testées sur des bioanodes n'ont pas forcément les mêmes effets sur des biocathodes.

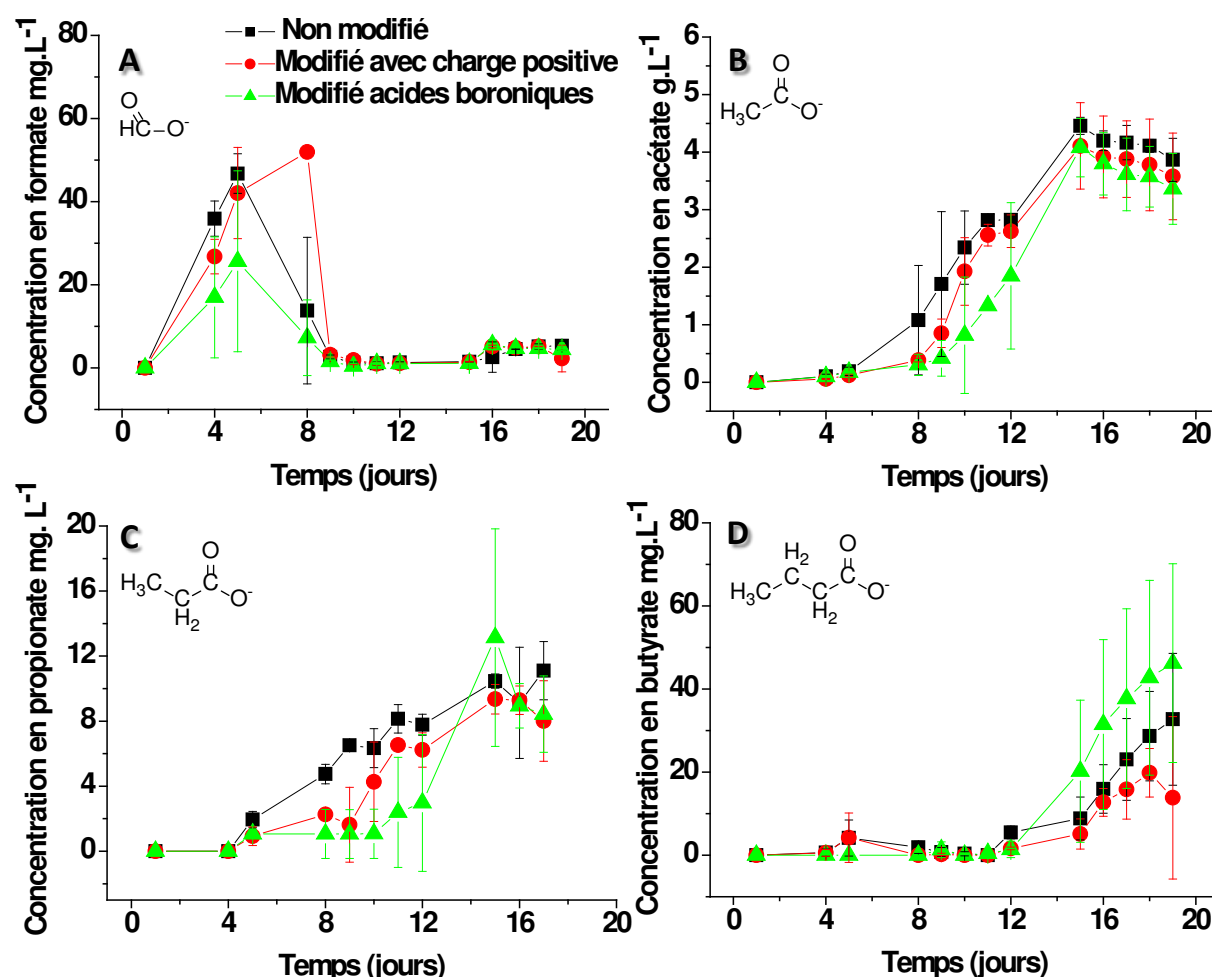


Figure 25 Production d'acides organiques (A : formate. B : acétate. C : Propionate. D : Butyrate) dans les électrolyseurs étudiés : cathodes non modifiées (noir), cathodes modifiées avec fonctions triméthyle ammonium (rouge), cathodes modifiées avec des fonctions acides boroniques (vertes). Les courbes sont réalisées à partir des moyennes des deux électrolyseurs du duplicat

La modification avec des fonctions acides boroniques semblent entraîner des performances et des comportements légèrement différents de ceux observés sur les deux autres électrodes. Pour cette modification avec des acides boroniques, la production d'acétate est retardée et ne débute qu'après le second ajout de CO_2 . Elle est suivie rapidement de la production de propionate et de butyrate. En fin d'expérience, les concentrations en acétate et propionate de ce réacteur sont équivalentes à celles retrouvées dans les autres réacteurs. La production en butyrate débute avant les autres réacteurs et y est 1.5 à 2 fois supérieure. Une hypothèse serait que les conditions de vie combinées à la modification de surface d'électrode pourraient avoir sélectionné une espèce de bactéries en particulier parmi les six espèces microbiennes introduites dans le réacteur. Cette espèce permettrait la production plus efficace d'acide gras volatil à 4 carbones dans le réacteur.

Ces premiers résultats semblent très intéressants, en particulier en ce qui concerne les mécanismes de production des acides gras volatils. En ce qui concerne les effets de modifications de surface, on ne peut pas encore tirer de conclusions au vu de la disparité des résultats. D'autres expériences sont nécessaires pour confirmer ou non ces premiers résultats.

Conclusion

Les biocathodes microbiennes catalysant la réduction du dioxygène à haut potentiel sont des biocathodes difficiles et lentes à développer. Très peu d'études publiées mettent en évidence une catalyse efficace par des microorganismes cathodiques. Les biofilms cathodiques que nous sommes parvenus à développer font partie de ces quelques biocathodes très performantes : Grâce à cette association, le dioxygène est directement fourni au biofilm électroactif. On observe une réduction du dioxygène débutant autour de +0.2 V vs ECS contre -0.2 V vs ECS pour une cathode en graphite abiotique dans les mêmes conditions. La réduction du dioxygène à haut potentiel par le biofilm cathodique permet une diminution de surtension de réduction dioxygène comparable à celle obtenue avec un catalyseur métallique classique comme le platine. Les densités de courant délivrées sont cependant encore faibles. Afin d'obtenir des biocathodes plus efficaces, la quantité de bactéries connectées à la cathode doit augmenter. Un moyen d'augmenter cette connexion est de mieux comprendre la formation de ces biofilms et leur composition et optimiser les propriétés de surface des cathodes en fonction des espèces microbiennes impliquées dans la réduction du dioxygène à haut potentiel. La modification que nous avons testée, bénéfique sur des biofilms microbiens anodiques, n'a pas montré d'effet sur la connexion des biofilms cathodiques. Nos résultats semblent cependant indiquer que la réduction du dioxygène à haut potentiel sur nos biocathodes microbiologiques tient à une association entre des algues et des bactéries. Une modification pertinente doit être trouvée pour favoriser le développement de ces deux types de microorganismes à la cathode.

Les biocathodes de microorganismes acétogènes catalysant la réduction de CO_2 en acides organiques constituent une découverte encore plus récente (2010). Nos premières études de catalyse avec un consortium de microorganismes acétogènes défini au départ indiquent une production séquentielle d'acides organiques à chaîne aliphatique de plus en plus longue. Il s'agit de la première mise en évidence d'un tel procédé dans des électrolyseurs microbiens. Les expériences de modification de surface d'électrode testées en duplicat montrent peu de reproductibilité et doivent donc être réitérées afin de confirmer ou non leur effet sur les performances des biocathodes microbiennes à électrosynthèse. Une modification intéressante serait de favoriser une espèce performante dans la synthèse d'acides gras volatils à longue chaîne pour lequel la plus value serait très plus importante que pour des acides à chaîne plus courte.

Section expérimentale

Biocathodes réduisant le dioxygène

Dispositifs utilisés

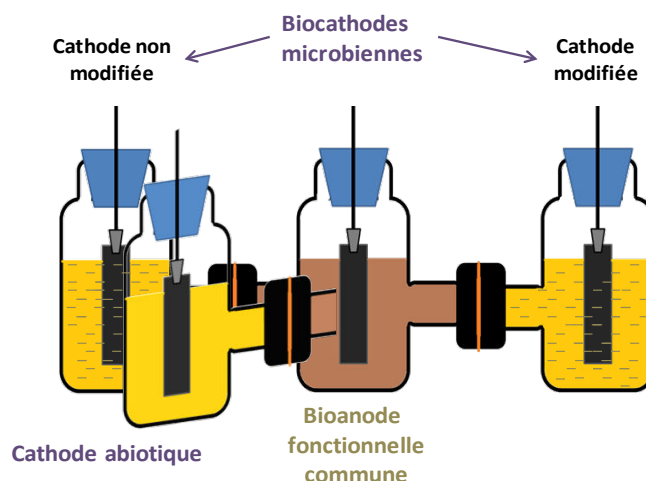


Figure 26 Schéma du dispositif utilisé pour l'étude de l'effet de la modification sur les performances de biocathodes microbiennes catalysant la réduction du dioxygène

La bioanode commune est d'abord élevée dans un dispositif de pile en H classique similaire à ce qui est décrit pour le Chapitre 2. Une fois que la bioanode est développée, elle est transférée dans le dispositif schématisé **Figure 26**. Le milieu anodique est du tampon phosphate pH 7 à 20 mM, le substrat fourni est de l'acétate (20 mM) et est remplacé régulièrement. A la cathode, le milieu est le même que celui décrit Chapitre 2, mais l'acétate n'est pas fourni. La seule source de carbone est du bicarbonate. L'inoculum utilisé est un échantillon des boues activées de la station d'épuration de Beaurade (Rennes) La station est équipée pour traiter des pollutions organiques et azotées, les boues récupérées sont donc susceptibles de contenir des bactéries nitrifiantes et dénitrifiantes. Un bullage d'air est maintenu dans les 3 catholytes à l'aide de pompes à aquarium.

Mesures effectuées

(voir Chapitre 2)

Biocathodes réduisant le CO₂ en acides organiques

Dispositifs utilisés

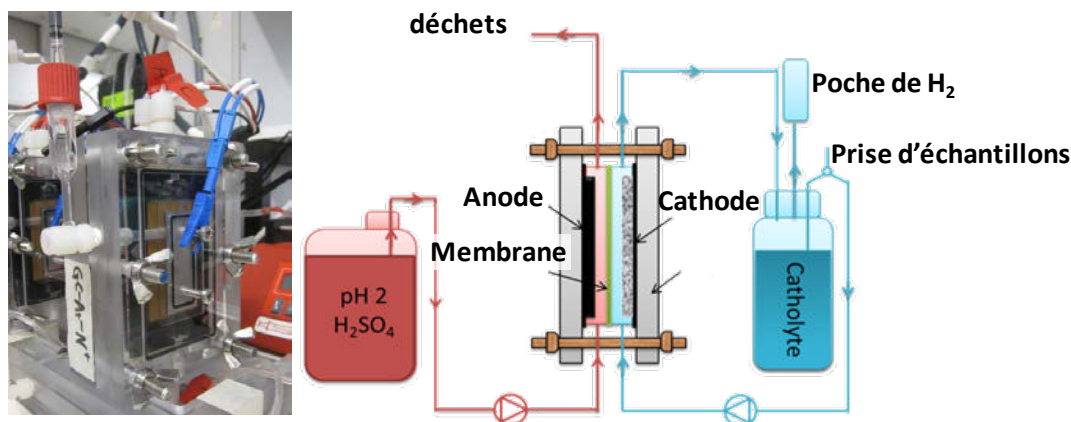


Figure 27 Photo et schéma des réacteurs de microbioélectrosynthèse (source : S. Gildemyn, LabMET)

Il s'agit de réacteurs à circulation composés d'un compartiment anodique et d'un compartiment cathodique de 8 cm³ chacun, séparés par une membrane échangeuse de cation (CEM). L'anode est une plaque de carbone vitreux et la cathode est un feutre de graphite. La surface géométrique utilisée pour chaque électrode est de 5 cm². Avant toute utilisation, les feutres commerciaux sont prétraités durant une nuit dans une solution de HCl à 0.1 M puis une deuxième nuit dans une solution de 0.1 M de NaOH. Ce prétraitement permet de nettoyer et d'activer le feutre avant son utilisation.

Un courant électrique de -750 μ A est appliqué à la cathode (électrode de travail) à l'aide d'un potentiostat, d'une électrode de référence Ag/AgCl placée dans le compartiment anodique et de l'anode servant de contre-électrode. Une pompe péristaltique permet la recirculation d'une solution de catholyte de 100 mL à une vitesse de 30 mL/h. Le compartiment anodique fonctionne en mode continu. Une pompe fait circuler une solution d'acide sulfurique à pH 2 à une vitesse de 30 mL/h.

Le catholyte est composé de 0.2 g/L K₂HPO₄, 0.25 g/L de NH₄Cl, 0.5 g/L KCl, 0.15 g/L de CaCl₂ 2H₂O, 0.6 g/L de MgCl₂ 2H₂O, 1.2 g/L NaCl, 0.5 g/L d'extrait de levure, 0.2 g/L de tryptone, 30 mL/L de NaHCO₃, 70mL/L de cystéine HCl, 0.1 mL/L de tungstate de selenium, 1 mL/L de solution d'éléments trace décrite dans le Chapitre 1, 2.5 mL/L de solution de vitamine dont la composition est décrite dans le Chapitre 1. L'agent réducteur sulfure de sodium est ajouté afin de se trouver en conditions anaérobies au niveau du compartiment cathodique et permettre le

développement des bactéries du biofilm. Le caractère anaérobie du compartiment cathodique est contrôlé grâce à un indicateur redox coloré, la résazurine. Cet indicateur est incolore lorsqu'il est réduit et devient rose lorsqu'il est oxydé par le dioxygène.

Source d'inoculum

6 cultures pures de microorganismes homoacétogènes ont été utilisées pour l'inoculum : *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium butylicum*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium acetobutylicum* et *Acetobacterium woodii*. Un mélange contenant 5×10^3 cellules. L⁻¹ a été réalisés et 25 mL de ce mélange a été jouté à chaque catholyte.

Mesures effectuées

Mesure de la concentration en acides gras volatils :

1 mL de catholyte est échantillonné chaque jour. Lors de l'échantillonnage, la pression dans les électrolyseurs est maintenue en injectant du diazote. Ces échantillons sont analysés par chromatographie gazeuse (Shimadzu GC 2014 FID) après extraction au diéthyle éther (méthode standard décrite dans Greenberg et al. 1992).

Mesure de la concentration en CO₂ dans le catholyte

Afin de vérifier la concentration en CO₂ servant d'accepteur d'électrons dans les électrolyseurs microbiens, 1mL de catholyte est échantillonné chaque jour. Cet échantillon est injecté dans un tube scellé contenant 1 mL d'acide sulfurique à 1 M, en sous pression. Après 24h de réactions et mise à pression atmosphérique, les bicarbonates transformés en CO₂ sont récupérés. 1mL d'échantillon de gaz est prélevé dans les tubes scellés et analysé par chromatographie gazeuse (Compact GC, Global analyser solutions).

Références du Chapitre 5

A

Aldrovandi A., Marsili E., Stante L., Paganin P., Tabacchioni S., Giordano A.
Bioresource Technology **130**, 2009, 3252-3260
“Sustainable power production in a membrane-less and mediator-less synthetic wastewater microbial fuel cell”

B

Bergel A., Féron D., Mollica A.
Electrochemistry Communications **7**, 2005, 900-904
“Catalysis of oxygen reduction in PEM fuel cell by seawater biofilm”

C

Castelle C., Guiral M., Malarte G., Ledgham F., Leroy G., Brugna M., Guiduci-Orticoni M. T.
Journal of Biological Chemistry **283**, 2008, 25803-25811
“A new iron-oxidizing/O₂-reducing supercomplex spanning both inner and outer membranes, isolated from the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*”

Chen G. W., Choi S. J., Lee T. H., Lee G. Y., Cha J. H., Kim C. W.
Applied Microbiology and Biotechnology **79**, 2008, 379-388
“Application of biocathode in microbial fuel cells: cell performance and microbial community”

Chen G. W., Cha J. H., Choi S. J., Lee T. H., Kim C. W.
Korean Journal of Engineering **27**, 2010, 828-835
“Characterization of an open biocathode microbial fuel cell for electricity generation and effluent polish”

Cournet A., Délia M. L., Bergel A., Roques C., Bergé M.
Electrochemical Communications **12**, 2010, 505-508
“Electrochemical reduction of oxygen catalyzed by a wide range of bacteria including Gram-positive”

D

De Schamphelaire L., Boeckx P., Verstraete W.
Applied Microbial Technology **87**, 2010, 1675-1687
“Evaluation of biocathodes in freshwater and brackish sediment microbial fuel cells”

E

Erable B., Féron D., Bergel A.
ChemSusChem **5**, 2012, 975-987
“Microbial catalysis of the oxygen reduction reaction for microbial fuel cells: a review”

Erable B., Vandecandelaere I., Faimali M., Delia M. L., Etcheverry L., Vandamme P., Bergel A.
Bioelectrochemistry **78**, 2010, 51-56
“Marine aerobic biofilm as a biocathode catalyst”

F

Freguia S., Rabaey K., Yuan Z., Keller J.

Water Research **42**, 2008, 1381-1396

"Sequential anode-cathode configuration improves cathodic oxygen reduction and effluent quality of microbial fuel cells"

Freguia S., Tsujimura S., Kano K.

Electrochimica Acta **55**, 2010, 813-818

"Electron pathways in microbial oxygen biocathodes"

G

Gadja I., Greenman J., Melhuish C., Ieropoulos I.

International Journal of Hydrogen Energy, in press

"Photosynthetic cathodes for microbial fuel cells"

Gonzalez del Campo A., Canizares P., Rodrigo M. A., Fernandez F. J., Lobato J.

Journal of Power Sources **242**, 2013, 638-645

"Microbial fuel cell with an algae-assisted cathode: a preliminary assessment"

Greenberg A. E., Clesceri L. S., Eaton, A. D.

American Public Health Association 1992.

"Standard methods for the examination of water and wastewater"

Guo K., Freguia S., Dennis P. G., Chen X., Donose B. C., Keller J., Gooding J. J., Rabaey K.

Environmental Science and Technology **47**, 2013, 7563-7550

"Effects of surface charge and hydrophobicity on anodic biofilm formation, community composition, and current generation in bioelectrochemical systems"

H

Harnisch F., Schröder U.

Chemical Society Reviews **39**, 2010, 4433-4448

"From MFC to MXC: chemical and biological cathodes and their potential for microbial bioelectrochemical systems"

K

Kinoshita K.

Wiley Interscience, 1992

"Electrochemical oxygen Technology"

L

Lapinsonnière L., Picot M., Poriol C., Barrière F.

Electroanalysis **25**, 2013, 601-605

"Phenylboronic Acid Modified Anodes Promote Faster Biofilm Adhesion and Increase Microbial Fuel Cell Performances"

Liu X. W., Sun X. F., Huang Y. X., Li D. B., Zeng R. J., Xiong L., Sheng G. P., Li W. W., Cheng Y. Y., Wang S. G., Yu H. Q.

Biotechnology and Bioengineering **110**, 2013, 173-179

"Photoautotrophic cathodic oxygen reduction catalyzed by green alga *Chlamydomonas reinhardtii*"

Lobato J., Gonzalez del Campo A., Fernandez F. J., Canizares P., Rodrigo M. A.

Applied Energy **110**, 2013, 220-226

"Lagooning Microbial fuel cells: a first approach by coupling electricity-coupling microorganisms and algae"

Logan B. E., Rabaey K.

Science **337**, 2012, 686-690

"Conversion of wastes into bioelectricity and chemicals by using microbial electrochemical technologies"

Lyautey E., Cournet A., Morin S., Balêtreau S., Etcheverry L., Charcosset J. Y., Delmas F., Bergel A., Garabetian F.

Applied and Environmental Microbiology **77**, 2011, 5394-5401

"Electroactivity of phototrophic river biofilm and constitutive cultivable bacteria"

M

Marshall C. W., Ross D. E., Fichot E. B., Norman R. S., May H. D.

Applied and Environmental Microbiology **78**, 2012, 8412-8420

"Electrosynthesis of commodity chemical by an autotrophic microbial community"

N

Nevin K. P., Woodard T. L., Franks A. E., Summers Z. M., Lovley D. R.

mBio **1**, 2010, 1-4

"Microbial Electrosynthesis: feeding microbes electricity to convert carbon dioxide and water to multicarbon extracellular organic compounds"

Nevin K. P., Hensley S. A., Franks A. E., Summers Z. M., Ou J., Woodard T. L., Snoyenbos-West O. L., Lovley D. R.

Applied and Environmental Microbiology **77**, 2011, 2882-2886

"Electrosynthesis of organic compounds from carbon dioxide is catalyzed by a diversity of acetogenic microorganisms"

P

Parot S., Vandecandelaere I., Cournet A., Délia M. L., Vandamme P., Bergé M., Roques C., Bergel A.

Bioresource Technology **102**, 2011, 304-311

"Catalysis of the electrochemical reduction of oxygen by bacteria isolated from electroactive biofilms formed in seawater"

Picot M., Lapinsonnière L., Rothballer M., Barrière F.

Biosensors and Bioelectronics **28**, 2011, 181-188

"Graphite anode surface modification with controlled reduction of specific aryl diazonium salts for improved microbial fuel cells power output"

R

Rabaey K., Read S. T., Clauwaert P., Freguia S., Bond P. L., Blackall L. L., Keller J.

ISME Journal **2**, 2008, 519-527

"Cathodic oxygen reduction catalyzed by bacteria in microbial fuel cells"

Rabaey K., Girguis P., Nielsen L. K.

Current Opinion in Biotechnology **22**, 2011, 371-377

"Metabolic and practical considerations on microbial electrosynthesis"

Rosenbaum M., Aulenta F., Villano M., Angenent L. T.

Bioresource Technology **102**, 2011, 324-333

"Cathodes as electrons donors for microbial metabolism: Which extracellular electron transfer mechanisms are involved?"

S

Strik D. P. B. T. B., Hamelers H. V. M., Buisman C. J. N.

Environmental and Science Technology **44**, 2010, 532-537

"Solar energy powered Microbial Fuel Cells with a reversible bioelectrode"

Strik D. P. B. T. B., Picot M., Buisman C. J. N., Barrière F.

Electroanalysis **25**, 2013, 652-655

"pH and Temperature Determine Performance of Oxygen Reducing Biocathodes"

T

Ter Heijne A., Strik D. P. B. T. B., Hamelers H. V. M., Buisman C. J. N.

Environmental Science and Technology **44**, 2010, 7151-7156

"Cathode potential and mass transfer determine performance of oxygen reducing biocathodes in microbial Fuel Cells"

W

Wang X., Cheng S. A., Feng Y. J., Merrill M. D., Saito T., Logan B. E.

Environmental Science and Technology **40**, 2009, 6870-6874

"Use of carbon mesh anodes and the effects of different temperature pretreatment methods on power production in microbial fuel cells"

X

Xia X., Sun Y., Liang P., Huang X.

Bioresource Technology **120**, 2012, 26-33

"Long-term effect of set potential on biocathodes in microbial fuel cells: Electrochemical and phylogenetic characterization"

Z

Zhang G. D., Zhao Q. L., Jiao Y., Zhang J. N., Jiang J. Q., Ren Z., Kim B. H.

Journal of Power Sources **196**, 2011, 6036-6041

"Improved performance of microbial fuel cell using combination biocathode of graphite brush and graphite granules"

Zhang T., Nie H., Bain S. T., Lu H., Cui M., Snoyenbos-West O. L., Franks A. E., Nevin K. P., Russel T. P., Lovley D. R.

Energy and Environmental Science **6**, 2013, 217-224

"Improved cathode materials for microbial electrosynthesis"



Conclusions générales et Perspectives

Les systèmes microbioélectrochimiques constituent une nouvelle catégorie de piles biologiques exploitant les réactions enzymatiques et les réseaux redox de microorganismes électroactifs ¹. Après une revue bibliographique présentant les mécanismes de fonctionnement des anodes et cathodes microbiennes ainsi que leurs applications et leurs limites, les résultats de ce travail de thèse ont été décrits et discutés.

Adaptation des bioanodes à l'oxydation de substrats complexes fermentescibles

Nous avons montré que l'efficacité de la conversion des eaux usées en électricité dépend de facteurs multiples tels que la nature des déchets organiques à convertir, la maturité du biofilm ou encore le mode de fonctionnement de l'anode. Nous avons observé que pour l'oxydation de substrats fermentescibles, la diversité des espèces microbiennes de biofilms jeunes permet de réduire le temps d'adaptation au substrat fermentescible et d'augmenter l'efficacité de la conversion. Nous avons constaté que la dégradation de substrats fermentescibles à l'anode peut être problématique. Par exemple, l'utilisation de substrats fermentescibles peut entraîner la croissance excessive de microorganismes non électroactifs qui ne participent pas à la génération d'électricité. Cette prolifération est néfaste car elle a pour conséquence une baisse de l'efficacité faradique mais aussi une baisse des performances électriques par colmatage de la membrane échangeuse de cations séparant anode et cathode. Ce problème se pose en particulier avec des systèmes de piles sans flux ou avec un flux d'anolyte renouvelé lentement. D'autre part, et de façon surprenante, même lorsque les bactéries non électroactives participent indirectement à la génération d'électricité, leur prolifération excessive peut entraîner la diminution des performances des piles. En effet, nos résultats suggèrent que ces bactéries diminuent la conductivité des biofilms et diminuent ainsi les courants catalytiques délivrés par les biofilms.

Les résultats de cette étude posent la question de l'évolution des performances et de l'efficacité de biofilms électroactifs dans un milieu comme les eaux usées brutes où les communautés bactériennes ne sont pas figées et contrôlées. En effet, on peut penser que des piles microbiennes utilisées avec des eaux usées brutes sont susceptibles d'être envahies par des communautés microbiennes non électroactives, rendant la technologie des piles microbiennes moins efficace. Des solutions peuvent être envisagées, notamment en adaptant l'utilisation des bioanodes à des effluents riches en acides organiques facilement et directement dégradables par les bactéries électroactives.

Amélioration de la connexion de biofilms anodiques

Un autre thème d'étude de ce travail de thèse a été l'amélioration de la connexion des biofilms électroactifs à l'anode grâce à la fonctionnalisation de surface. Les modifications jusqu'ici testées dans la littérature, y compris par notre groupe ², ont permis de moduler les propriétés physico-chimiques globales des surfaces d'anode. Ici, notre stratégie s'est démarquée car elle a permis de greffer des fonctionnalités chimiques, les acides phényles boroniques, capables de se complexer avec des glucides de la membrane externe des bactéries. Cette modification vise donc un composant spécifique des bactéries. Cette fonctionnalisation a tout d'abord été testée sur graphite ³. L'étude a permis de démontrer que les acides phényle boroniques greffés permettent de réduire le temps de formation des biofilms et d'augmenter les performances électriques des bioanodes développées. Cette fonctionnalisation a également été testée sur un matériau d'électrode original : des nanotubes de carbone déposés en film sur du graphite. Nous avons observé que les nanotubes de carbone non modifiés permettent en eux-mêmes une amélioration des performances des biofilms, en accord avec ce qui est décrit dans la littérature. De plus, nous avons constaté que la combinaison des nanotubes de carbone et de la fonctionnalisation avec des acides boroniques greffés permettait d'augmenter de façon significative l'adhésion des bactéries et les performances des bioanodes développées (*article en cours de rédaction*).

Si les résultats de ces deux études sont en accord avec l'hypothèse de départ d'une interaction privilégiée entre les acides phényles boroniques greffés et les lipopolysaccharides de la membrane externe des bactéries, il n'est pas exclu que les molécules introduites en surface aient d'autres effets physico-chimiques ou biologiques, notamment sur la physiologie des bactéries en contact direct avec l'électrode. Afin de mieux comprendre si l'interaction entre bactéries et acides phényle boroniques est liée ou non aux lipopolysaccharides de la membrane externe des bactéries, il faudrait tester la modification sur des bactéries anodiques présentant moins de lipopolysaccharides, par exemple des bactéries électroactives Gram positif (*Lactococcus lactis*, *Thermincola potens*).

Ces travaux ouvrent la voie à des fonctionnalisations de surface encore plus spécifiques. On peut en effet imaginer le greffage d'anticorps spécifiques aux souches ou aux espèces que l'on veut cibler en surface des électrodes. D'autre part, il est aussi intéressant d'étudier et de comparer l'effet des modifications sur des souches microbiennes pures (collaboration Université de Galway, Irlande).

Etude de biofilms cathodiques

Au cours de ce travail de thèse nous avons cherché à améliorer la connexion de biofilms cathodiques. On dispose de peu de données sur ces biofilms car leur découverte est plus récente. Il s'agit de biofilms en général plus difficiles à développer et moins performants. Bien que les modifications testées améliorent les performances de biofilms anodiques, elles n'ont pas démontré d'influence sur la connexion des bactéries aux cathodes. Ces résultats montrent que l'influence des modifications dépend des souches bactériennes impliquées dans les catalyses aux électrodes. Ces études ont cependant permis de mieux comprendre la formation et le fonctionnement des biofilms cathodiques : des biocathodes réduisant le CO_2 en acides organiques et des biocathodes réduisant le dioxygène à haut potentiel

Dans le cas des biocathodes catalysant la réduction de CO_2 en acides organiques, nos premières études de catalyse indiquent une production séquentielle d'acides organiques à chaîne aliphatique de plus en plus longue (collaboration Université de Gand, Belgique). La mise en évidence d'un tel procédé dans des électrolyseurs microbiens n'a pas encore été publiée. Les expériences de modification de surface d'électrode testées en duplicat montrent peu de reproductibilité et doivent donc être réitérées afin de confirmer ou non leur effet sur les performances des biocathodes microbiennes à électrosynthèse. Une stratégie pertinente serait de favoriser une espèce microbienne performante dans la synthèse d'acides gras volatils à longue chaîne pour lequel la plus value serait plus importante que pour des acides à chaîne plus courte ⁴.

Dans le cas des biocathodes réduisant le dioxygène dans des piles à combustible microbiologiques, nos résultats indiquent que la catalyse efficace par un biofilm microbien provient d'une association étroite entre bactéries et algues microscopiques. Grâce à cette association, le dioxygène est directement fourni au biofilm électroactif. On observe alors une réduction du dioxygène débutant autour de +0.2 V vs ECS contre -0.2 V vs ECS pour une cathode en graphite abiotique dans les mêmes conditions. La réduction du dioxygène à haut potentiel par le biofilm cathodique permet une diminution de la surtension de la réduction du dioxygène comparable à celle obtenue avec un catalyseur métallique classique comme le platine. Les densités de courant délivrées sont cependant encore faibles et suggèrent que la quantité de bactéries connectées à la cathode doit être plus élevée. Un moyen d'augmenter cette connexion est de mieux comprendre la composition du biofilm et d'optimiser les propriétés de surface des cathodes de façon pertinente pour les espèces microbiennes impliquées dans la réduction du

dioxygène à haut potentiel. L'association entre microorganismes électroactifs et algues microscopiques s'avère bénéfique pour obtenir des biocathodes performantes.

D'autres études ont mis en évidence l'intérêt de l'association algues-bactéries à la cathode⁵ mais aussi à l'anode. Ces études ont permis de définir une nouvelle catégorie de systèmes microbiélectrochimiques : les piles microbiennes photosynthétiques⁶. Parmi les configurations possibles à l'anode, on peut envisager qu'à partir de CO₂ et de lumière, des algues puissent produire par photosynthèse des nutriments (acides gras ou glucides) dont l'oxydation à l'anode serait catalysée par des bactéries électroactives et générerait de l'électricité (voir figure ci-dessous, droite). Sur certaines bioanodes que nous avons étudiées, nous avons observé des contaminations par de telles algues. Pour ces bioanodes, on observe en fin de batch, des augmentations périodiques du courant correspondant à des cycles jour/nuit, sans qu'aucun substrat ne soit ajouté manuellement (voir figure ci-dessous, gauche). Ces observations sont en accord avec l'association algues-microorganismes électroactifs décrite précédemment. Les piles à combustible microbiennes photosynthétiques sont des systèmes particulièrement intéressants car elles permettraient d'alimenter de façon autonome des dispositifs de mesures tels que des capteurs dans des milieux naturels difficiles d'accès.

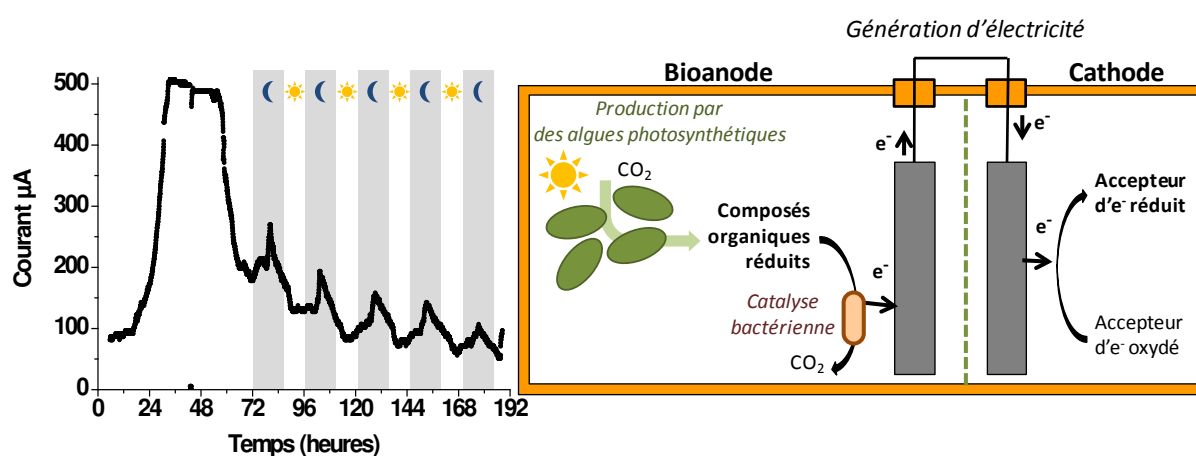


Figure Exemple de fonctionnement de piles microbiennes photosynthétiques, avec à l'anode une association entre microalgues et bactéries électroactives.

A gauche : Profil de courant généré (exemple d'une bioanode étudiée dans notre laboratoire). Après épuisement du substrat (ici lactose), le courant de la pile microbienne diminue. En fin de batch cependant, on constate une augmentation circadienne de la production d'électricité. Le jour, le courant est faible ce qui peut être attribué à une production d'O₂ par les algues qui inhibe le biofilm électroactif. La nuit, la photosynthèse et la production d'O₂ cessent et les composés organiques produits par les algues sont oxydés par le biofilm électroactif à l'anode.

A droite : schéma explicatif du fonctionnement d'un dispositif comportant une bioanode à algues.

Finalement, ce projet d'étude de thèse sur les systèmes microbiélectrochimiques extrêmement enrichissant a été l'occasion d'appréhender et d'associer des disciplines scientifiques multiples, notamment en électrochimie et en fonctionnalisation de surface. Cette

thèse m'a permis également de contribuer à la rationalisation de l'amélioration de l'interface biofilm-électrode.

Bien que l'application industrielle de ces dispositifs semble encore éloignée, on ne peut qu'admirer et s'enthousiasmer pour ce domaine scientifique pour lequel les avancées et la compréhension progressent très rapidement. Le développement de nouvelles catégories de systèmes microbioélectrochimiques rend cette recherche très dynamique et promet des applications technologiques et des avancées fondamentales sur la compréhension de la physiologie cellulaire.

¹ Lapinsonnière L., Picot M., Barrière F., *ChemSusChem* **5**, 2012, 995-1005

"Enzymatic versus Microbial bio-catalyzed electrodes in bio-electrochemical systems"

² Picot M., Lapinsonnière L., Rothballer, M., Barrière F., *Biosensors and Bioelectronics* **28**, 2011, 181-188

"Graphite anode modification with controlled reduction of specific aryl diazonium salts for improved microbial fuel cells power output"

³ Lapinsonnière L., Picot M., Poriol C., Barrière F., *Electroanalysis* **25**, 2013, 601-605

"Phenylboronic Acid Modified Anodes Promote Faster Biofilm Adhesion and Increase Microbial Fuel Cell Performances"

⁴ Logan B. E., Rabaey K., *Science* **337**, 2012, 686-690

"Conversion of wastes into bioelectricity and chemical by using microbial electrochemical technologies"

⁵ Strik D. P. B. T. B., Hamelers H. V. M., Buisman C. J. N.

Environmental and Science Technology **44**, 2010, 532-537

"Solar energy powered Microbial Fuel Cells with a reversible bioelectrode"

⁶ Rosenbaum M., He Z., Angenent L. T.

Current Opinion in Biotechnology **21**, 2010, 259-264

"Light energy to bioelectricity: photosynthetic microbial fuel cells"

VU :

Le Directeur de Thèse,

Frédéric BARRIERE

VU :

Le Responsable de l'Ecole Doctorale,

Jean François CARPENTIER

VU pour autorisation de soutenance

Rennes, le

Le Président de l'Université de Rennes 1,

Guy CATHELINEAU

VU après soutenance pour autorisation de publication :

Le président du Jury,

Résumé

Les systèmes microbioélectrochimiques exploitent le métabolisme de microorganismes particuliers afin de catalyser des réactions d'oxydoréduction. Ces microorganismes organisés en biofilms à l'anode ou à la cathode sont en général des bactéries dites électroactives et peuvent être exploités dans une multitude d'applications. Une revue bibliographique des aspects fondamentaux et applicatifs de ce domaine est présentée. La génération d'électricité couplée à l'épuration d'eaux usées à l'anode de piles à combustible microbiologiques a été étudiée. Des bioanodes développées à partir d'acétate (substrat non fermentescible) sont capables de s'adapter et de dégrader le glucose et le lactose (substrats fermentescibles). Leur adaptation et leurs performances dépendent de la maturité du biofilm, du substrat et du renouvellement régulier de l'anolyte. Les propriétés physico-chimiques de la surface des électrodes ont été modulées afin de promouvoir la connexion de biofilms. A l'anode, nous avons étudié le greffage covalent d'acides phényle boroniques susceptibles de se complexer avec des glucides de la membrane externe des bactéries. Cette fonctionnalisation permet de réduire le temps de formation des biofilms et d'en améliorer les performances électriques sur graphite et sur nanotubes de carbone à parois multiples. A la cathode, les modifications de surface connues sur les bioanodes n'ont pas démontré d'influence sur les performances des biocathodes. Les différentes phases du développement de biocathodes catalysant la réduction du dioxygène à haut potentiel ont été étudiées. Le suivi de biocathodes réduisant le CO₂ en acides organiques montre une production séquentielle d'acides organiques à chaîne aliphatique de plus en plus longue.

Mots-clés : biotechnologie, système microbio-électrochimique, traitement des eaux usées, modification de surface, acide boronique

Abstract

Microbial electrochemical devices use the metabolism of particular microorganisms to catalyze redox reactions. The microorganisms organized as biofilms onto anodes and cathodes are usually bacteria defined as electroactive and can be harnessed in electrochemical devices for several applications. A review of the fundamental and practical aspects of this field is presented. The simultaneous generation of electricity coupled to pollutant removal was studied at the anode of microbial fuel cells. Bioanodes developed with acetate (non-fermentable substrate) can adapt to the degradation of fermentable substrates (glucose and lactose). Their adaptation and performances depend on biofilm age, nature of the substrate and regular replacement of anolyte. The physico-chemical properties of electrode surfaces were tuned in order to promote microbial connection. At the anode, we investigated the covalent grafting of phenylboronic acids functionalities that are expected to bind with saccharides of the external membrane of bacteria. This functionalization leads to faster biofilm connection and higher performances of bioanodes on graphite and multi-walled carbon nanotubes.

At the cathode, the grafting of chemical functionalities that already proved beneficial to bioanodes did not influence the performances of biocathodes. Different development phases of biocathodes catalyzing O₂ reduction at high potential were studied. The monitoring of biocathodes catalyzing CO₂ reduction showed a successive generation of organic acids with increasing aliphatic chain length.

Key words: biotechnology, microbial electrochemical system, wastewater treatment, surface modification, boronic acid